



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS PARA INVESTIGAR A
LOCALIZAÇÃO E EFEITOS DE FÁRMACOS INCORPORADOS
EM MEMBRANAS LIPÍDICAS.**

VÂNIA RODRIGUES DE LIMA

Florianópolis - Santa Catarina, abril de 2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS PARA INVESTIGAR A
LOCALIZAÇÃO E EFEITOS DE FÁRMACOS INCORPORADOS
EM MEMBRANAS LIPÍDICAS.**

VÂNIA RODRIGUES DE LIMA

Tese apresentada como
parte integrante dos requisitos
necessários para obter o título de
DOUTORA EM QUÍMICA junto
ao Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal
de Santa Catarina.

Orientadora: Profa. Dra. TÂNIA BEATRIZ CRECZYNSKI-PASA
Co-orientador: Prof. Dr. MIGUEL SORIANO BALPARDA CARO

Florianópolis - Santa Catarina, abril de 2009

Vânia Rodrigues de Lima

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS PARA INVESTIGAR A
LOCALIZAÇÃO E EFEITOS DE FÁRMACOS INCORPORADOS EM
MEMBRANAS LIPÍDICAS**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutora em Química no
Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 23 de abril de 2009.

Prof. Dr. Ademir Neves

Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Orientadora

Prof. Dr. Miguel S. B. Caro

Co- Orientador QMC UFSC

Prof. Dr. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida

UFRJ

Prof. Dr. Nilo Zanatta

QMC, UFRGS

Prof. Dr. Edson Minatti

QMC, UFSC

Prof. Dr. Hernan Terenzi

CCB, UFSC

Prof. Dr. Valdir Soldi

QMC, UFSC

“...Criador, cuida de quem me cuidou, pega na
minha mão, me guia...”

(Sergio Meriti, César Belieny)

Este trabalho é dedicado a minha família
e a àqueles que possam vir a utilizar,
propagar e aprimorar tal conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À grande Força que move o mundo, por mais um ciclo de aprendizados vividos por Tua serva.

À minha orientadora, Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa por sempre incentivar meu crescimento profissional e humano. Por me ensinar que a ciência também deve ser produzida e vivida com emoção.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Miguel Caro, por me acompanhar e ensinar em meus passos em direção ao universo da Ressonância Magnética Nuclear aplicada ao estudo com membranas.

Ao Prof. Dr. Erick Joel Dufourc e sua equipe de pesquisa, por me acolherem em seu laboratório (IECB, Université Bordeaux 1, França) durante um ano, aprimorando nossos conhecimentos e ensaios com a RMN em membranas.

Ao Prof. Dr. André Pasa e ao seu grupo de trabalho, pelo suporte fornecido no aprendizado e experimentos no que diz respeito à microscopia de força atômica.

À Profa. Dra. Angela Machado de Campos, pelo suporte oferecido durante os experimentos de viscosimetria.

Ao Prof. Dr. Edson Minatti e ao Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho, pelo apoio fornecido nos estudos com espectrometria de fluorescência.

Ao Prof. Dr. Juan Claudio Benech por viabilizar ensaios de fluorescência no Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, bem como no Instituto Pasteur em Montevideo, Uruguai.

Ao Prof. Dr. Marcos Segatto e a MSc. Marly da Silveira Soldi, pelo apoio dado nos ensaios com calorimetria de varredura diferencial.

À Prof. Dra. Maria Inês Bruno Tavares e sua equipe de trabalho, por abrirem as portas de seu laboratório no IMA, UFRJ, e disponibilizar seu conhecimento para as medidas de RMN de tempo de relaxação em membranas.

Aos Professores membros da banca, Prof. Dr. Edson Minatti, Prof. Dr. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida, Prof. Dr. Hernan Terenzi, Prof. Dr. Nilo Zanatta e Prof. Dr. Valdir Soldi, cujo exemplo e profissionalismo inspiram a confiança em entregar-lhes este trabalho para avaliação.

Aos colegas de trabalho antigos e novos, Ana T., Andréia N., Andréia S., Betina, Bruno, Clarissa, Claudriana, Evelyn, Everton, Fernanda, Francisco, Inês, Julian, Juliana, Maurícia, Melina, Syntia, Róber, Tiago e Vânia N. Todos sempre guerreiros. Inspiradores.

À CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

Aos amigos verdadeiros, que se tornaram família. Obrigada de coração, por partilharmos a Vida.

À minha família, por me ensinar a todo instante que bondade é um exercício que nunca deve ser deixado de lado, não importa em que mundo nós estejamos. Obrigada por me mostrarem o que é generosidade e amor. Amo vocês, muito.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	29
1.INTRODUÇÃO.....	30
 CAPÍTULO II	33
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
2.1. Influência da composição lipídica nas propriedades das membranas.....	34
2.2. Modelos de membrana: lipossomas, filmes de langmuir e bicamadas suportadas em substrato sólido	36
2.2.1. Lipossomas	36
2.2.2. Filmes de Langmuir	38
2.2.3. Membranas suportadas em substrato sólido	41
2.2.3.1. Mica muscovita como substrato para bicamadas de fosfatidilcolina	43
2.3. Fármacos a serem testados no trabalho: melatonina e vincristina.....	44
2.3.1. Melatonina	44
2.3.2. Vincristina	46
2.4. Técnicas instrumentais utilizadas para caracterização de membranas	48
2.4.1. Ressonância magnética nuclear (RMN).....	48
2.4.1.1. RMN para amostras no estado líquido	49
2.4.1.1.1. Medidas de T_1 em membranas.....	52
2.4.1.2. RMN para amostras no estado sólido.....	53
2.4.1.2.1. Estudos de dinâmica lipídica- RMN do tipo estático (ou “wide line”) de ^2H e de ^{31}P	55
2.4.2. Espectroscopia de fluorescência	59

2.4.3. Calorimetria de varredura diferencial (DSC)	60
2.4.4. Medidas em cuba de Langmuir	62
2.4.5. Microscopia no ângulo de Brewster (BAM)	64
2.4.6. Microscopia de força atômica (AFM)	66
 CAPÍTULO III	 70
3. OBJETIVOS.....	71
 CAPÍTULO IV	 73
4. MATERIAIS E MÉTODOS	74
4.1. Reagentes e materiais utilizados no trabalho.....	74
4.2. Experimentos com lipossomas	74
4.2.1. Preparação dos lipossomas através do método de diálise	74
4.2.2. Preparação dos lipossomas através do método de hidratação de vesículas	75
4.2.3. Incorporação de melatonina aos lipossomas (MLV)	76
4.2.4. Incorporação de vincristina aos lipossomas (MLV), através de “gradiente” de pH	76
4.2.5. Determinação do percentual de incorporação dos fármacos nas vesículas	77
4.2.6. Medidas de RMN	77
4.2.6.1. RMN no estado líquido	78
Identificação das amostras	78
Medidas de tempo de relaxação longitudinal (T_1).....	78
4.2.6.2. RMN no estado sólido	79

Estudos de dinâmica molecular	79
Estudos da topologia da membrana	80
4.2.7. Experimentos de espectroscopia de fluorescência.....	81
4.2.8. Medidas de DSC	81
4.3. Experimentos com filmes de Langmuir	82
4.3.1. Formação do filme lipídico e determinação da variação da área molecular.....	82
4.3.2. Experimentos com microscopia no ângulo de Brewster	82
4.4. Experimentos com bicamadas lipídicas suportadas em substrato sólido.....	83
4.4.1. Preparação das bicamadas suportadas em mica.....	83
4.4.2. Obtenção das imagens de AFM.....	83
CAPÍTULO V.....	84
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
5.1. Estudos de lipossomas incorporados com melatonina	85
5.1.1. Determinação do percentual de incorporação	85
5.1.2. Medidas de RMN.....	86
5.1.2.1. Identificação da melatonina.....	86
5.1.2.2. Estudos de dinâmica molecular I: efeitos de melatonina na cadeia acil do lipídio observados através de medidas de T_1	88
5.1.2.3. Estudos de dinâmica molecular II: medidas de parâmetros obtidos a partir de RMN de ^2H e ^{31}P	92
5.1.2.3.1. Espectroscopia de RMN de ^2H	92
5.1.2.3.2. Espectroscopia de RMN de ^{31}P	96

5.1.2.4. Estudos referentes à topologia da membrana: RMN de ^1H com MAS.....	97
5.1.3. Medidas de espectroscopia de fluorescência.....	102
5.1.4. Medidas de DSC	104
5.2. Caracterização dos efeitos de melatonina em filmes de Langmuir	105
5.3. Caracterização dos efeitos de melatonina em bicamadas lipídicas suportadas em mica.....	107
5.4. Caracterização dos efeitos da melatonina em fosfatidilcolinas e implicações biológicas.....	109
5.5. Estudos de lipossomas incorporados com vincristina.....	112
5.5.1. Determinação do percentual de incorporação	112
5.5.2. Medidas de RMN.....	112
5.5.2.1. Identificação da vincristina.....	112
5.5.2.2. Estudos referentes à dinâmica molecular: Espectroscopia de RMN de ^2H	113
5.5.2.3. Estudos referentes à topologia da membrana: RMN de ^1H com MAS	115
5.5.3. Medidas de espectroscopia de fluorescência.....	118
5.5.4. Medidas de DSC	119
5.5.5. Caracterização dos efeitos de vincristina em lipossomas de fosfatidilcolina: implicações terapêuticas	120
CAPÍTULO VI.....	122
6.CONCLUSÕES	123

CAPÍTULO VII.....	127
7. PERSPECTIVAS.....	128
 CAPÍTULO VIII.....	 129
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
 ANEXO- Artigos publicados ou em preparação	 153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação de uma molécula de fosfatidilcolina	36
Figura 2- Representação esquemática de MLV, LUV e SUV, e as respectivas bicamadas	37
Figura 3- Representação de um filme de Langmuir, formado por lipídios em uma subfase aquosa	39
Figura 4- Isoterma de pressão de superfície para um filme de DPPC.....	40
Figura 5- Representação esquemática de uma bicamada suportada em substrato sólido	41
Figura 6- Representação esquemática das etapas associadas à fusão de vesículas em um substrato sólido.....	42
Figura 7- Estrutura de mica muscovita.....	44
Figura 8- Estrutura da melatonina.....	45
Figura 9- Estrutura da vincristina.....	46
Figura 10- Representação esquemática da incorporação de vincristina em lipossomas através de “gradiente de pH”	47
Figura 11- Sinal de FID e sinal de domínio de frequência obtido depois de aplicar a transformada de Fourier.....	49
Figura 12- Valores de tempo de relaxação longitudinal em função do tempo de correlação.	52

Figura 13- Espectro de RMN de ^2H antes e após o De-Pake-ing, e associações entre os dubletos quadrupolares e as posições dos carbonos deuterados na cadeia lipídica.	58
Figura 14- Representação esquemática da redução dos valores de momentos espectrais em função da temperatura, caracterizando a transição de fase sólido-ordenada para fluida.	58
Figura 15- Estrutura da merocianina 540.	60
Figura 16- Arranjo experimental de calorimetria de varredura diferencial por fluxo de calor.	61
Figura 17 - Representação esquemática da balança de Langmuir, incluindo a barreira móvel e os sensores de pressão.....	63
Figura 18- Representação esquemática da mudança de refletividade da luz incidente no ângulo de Brewster na ausência e presença do filme de Langmuir	66
Figura 19- Representação esquemática dos componentes de um aparelho de AFM	67
Figura 20 - Imagem de AFM de uma membrana de DMPC: DOPC suportada em mica	68
Figura 21 - Esquema de diálise para preparação de lipossomas unilamelares	75
Figura 22 – Esquema da preparação de vesículas multilamelares pelo método de hidratação de vesículas	76
Figura 23 – Quantificação da melatonina incorporada nos lipossomas de EPC em função do tempo	85
Figura 24- Espectro de RMN de ^1H de melatonina em mistura de $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$	86

Figura 25 – Espectro de RMN APT de ^{13}C de melatonina.....	88
Figura 26 – Influência de melatonina no T_1 de ^1H de lipossomas compostos por EPC em tampão de diálise.	89
Figura 27 - Determinação do T_1 de ^{13}C em lipossomas compostos por EPC na ausência e presença de melatonina.....	91
Figura 28 - Espectros de ^2H RMN de $^2\text{H}_{27}$ - DMPC na ausência ou presença de melatonina, em diferentes temperaturas.....	92
Figura 29 - Variação térmica dos valores de momentos espectrais de primeira ordem e parâmetros de ordem globais de vesículas contendo $^2\text{H}_{27}$ – DMPC na ausência e presença de melatonina.	94
Figura 30 - Influência de melatonina nos valores de parâmetros de ordem de lipossomas contendo EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC. Detalhe: espectros de ^2H RMN de vesículas EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC na ausência e presença de melatonina, após deconvolução espectral.....	95
Figura 31 - Espectros de RMN de ^{31}P de lipossomas contendo EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC, na presença e ausência de melatonina	96
Figura 32 - Variação térmica dos valores de anisotropia de deslocamento químico de $^2\text{H}_{27}$ - DMPC, em função da incorporação de melatonina no sistema.	97
Figura 33 - Espectro de RMN HRMAS de ^1H de lipossomas de EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC na ausência e presença de melatonina.	100
Figura 34 - Espectro bidimensional de NOESY de lipossomas de EPC: $^2\text{H}_{31}$ POPC, na presença de melatonina.....	101

Figura 35- Espectros de emissão de fluorescência de MC-540 em solução aquosa na presença de lipossomas de EPC e na presença de lipossomas de EPC contendo melatonina.....	103
Figura 36 - Curvas de DSC de lipossomas de EPC puros e lipossomas de EPC contendo melatonina	104
Figura 37 - Variação da área molecular e espessura de uma monocamada de POPC em função da concentração de melatonina incorporada no sistema.....	106
Figura 38 - Imagens de AFM e histogramas relativos a bicamadas suportadas em mica de DMPC e de DMPC contendo melatonina.....	108
Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H de vincristina.em mistura de $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$	112
Figura 40 - Espectros de RMN de ^2H de EPC: $^2\text{H}_{31}$ - POPC na ausência e presença de vincristina.	114
Figura 41- Espectros de RMN de ^2H de $^2\text{H}_{27}$ - DMPC na ausência e presença de vincristina, em função da variação térmica do sistema.....	114
Figura 42- Variação térmica dos valores de momentos espectrais de primeira ordem de vesículas contendo $^2\text{H}_{27}$ – DMPC na ausência e presença de vincristina.....	115
Figura 43 - Espectro de EPC: $^2\text{H}_{31}$ POPC na presença de vincristina, obtido na ausência de rotação no ângulo mágico.....	116
Figura 44 - Espectros de RMN de HRMAS de ^1H de lipossomas de EPC: $^2\text{H}_{31}$ – POPC na ausência e presença de vincristina.	117

Figura 45 - Espectros de emissão de fluorescência de MC-540 em solução aquosa na presença de lipossomas de EPC e na presença de lipossomas de EPC contendo vincristina.....	118
--	-----

Figura 46- Curvas de DSC de lipossomas de EPC puros e lipossomas de EPC contendo vincristina	119
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de deslocamentos químico δ (ppm) de ^{13}C e ^1H presentes na melatonina e correlações homo e heteronucleares.....	87
Tabela 2 - Influência de melatonina no T_1 de ^1H presentes em lipossomas de EPC	90
Tabela 3 - Efeito de melatonina no T_1 de ^{13}C presentes em lipossomas de EPC.....	91
Tabela 4 - Variações dos deslocamentos químicos dos hidrogênios referentes ao sistema EPC: $^2\text{H}_{31}$ POPC, induzidos por melatonina.....	99
Tabela 5 - Interações espaciais intermoleculares de NOESY entre melatonina e lipossomas contendo EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC.....	102
Tabela 6 - Influência de melatonina na razão de intensidade de fluorescência nos comprimentos de onda 580 e de 565 nm.....	103
Tabela 7 - Parâmetros de DSC obtidos para lipossomas de EPC na ausência e na presença de melatonina	105
Tabela 8 - Valores de deslocamentos químico δ (ppm) de ^1H presentes na vincristina e correlações homonucleares.....	113
Tabela 9 - Variações nos valores de deslocamento químico ($\Delta\delta$, ppm) de lipossomas de EPC: $^2\text{H}_{31}$ – POPC após interação com vincristina.....	117
Tabela 10 - Parâmetros de DSC obtidos para lipossomas de EPC na ausência e na presença de vincristina	120

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Determinação da frequência de absorção da radiação eletromagnética pro um núcleo.....	48
Equação 2 – Relação entre a frequência da banda de ressonância e a constante de relação magnética predominante.....	53
Equação 3 – Determinação dos valores de desdobramento quadrupolar	55
Equação 4 – Relação entre o parâmetro de ordem e o momento espectral	56
Equação 5 - Cálculo para obtenção do valor do calor liberado ou absorvido pela amostra durante a transição (dH/dt)	61
Equação 6 – Determinação do ângulo de Brewster	64

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	— constante dependente da interação magnética predominante
AFM	— microscopia de força atômica
A_Q	— constante de acoplamento quadrupolar estática
BAM	— microscopia no ângulo de Brewster
B_0	— campo magnético externo
B_1	— campo magnético gerado pelo pulso de radio frequência no sistema
CCD	— câmera do tipo “charged coupled device”
DSC	— calorimetria de varredura diferencial
C_s	— soma das capacidades caloríficas referentes à amostra e a referência
C.S.A	— anisotropia do deslocamento químico
C_r	— capacidade calorífica da referência
dH/dt	— calor liberado ou absorvido pela amostra durante a transição por unidade de tempo
DMPC	— dimiristoilfosfatidilcolina
dq/dt	— fluxo de energia registrado pelo aparelho de DSC
DPH	— difenilhexatrieno
DSC	— calorimetria de varredura diferencial
ΔH	— variação de entalpia
ΔG	— variação da energia livre de Gibbs
Δq	— área sobre o pico da curva

ΔS	— variação da entropia
ΔT	— variação de temperatura
$\Delta \nu_Q$	— desdobramento quadrupolar
δ	— deslocamento químico
EPC	— fosfatidilcolina de ovo fresco
EPC: $^2H_{31}$ POPC	— fosfatidilcolina de ovo fresco associada a palmitoil fosfatidilcolina seletivamente deuterada
FID	— decaimento de indução livre
γ	— razão magnetogírica do núcleo
H_{II}	— fase hexagonal invertida
$^1H, ^1H$ COSY	— espectroscopia de correlação $^1H, ^1H$
$^2H_{27}$ -DMPC	— dimiristoilfosfatidilcolina seletivamente deuterada
HEPES	— ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
HRMAS	— RMN de alta resolução com rotação no ângulo mágico
Hz	— hertz
I	— número quântico de spin
J	— multiplicidade ou constante de acoplamento
L_α	— fase fluida
L_β	— fase gel ou sólido-ordenada
LPO	— lipoperoxidação
LUV	— vesículas grandes unilamelares
λ_{max}	— comprimento de onda máximo
MAS	— rotação no ângulo mágico
MC-540	— merocianina 540

MeI	— melatonina
MLV	— vesículas grandes multilamelares
M ₁	— momento espectral de primeira ordem
n	— quantidade de núcleos que interagem com o núcleo correspondente ao sinal
<i>n</i>	— índice de refração
NOESY	— espectroscopia de efeitos Overhauser nuclear
θ_B	— ângulo de Brewster
POPC	— palmitoil oleoil fosfatidilcolina
R	— resistência térmica
RMN	— ressonância magnética nuclear
σ	— constante de blindagem
S	— parâmetro de ordem
S _{CD}	— parâmetro de ordem das cadeias seletivamente deuterada
SUV	— pequenas vesículas unilamelares
T _m	— temperatura de transição de fases gel para fluida
T _p	— temperatura do disco termoeletrico do aparelho
TSP	— ácido 2,2,3,3- <i>d</i> ₄ -3-trimetilsililpropionico
T ₁	— relaxação longitudinal
T ₂	— relaxação transversal
τ_c	— tempo de correlação
VCR	— vincristina
ω	— frequência da banda de ressonância

RESUMO

Este trabalho apresenta estratégias para caracterizar alterações promovidas por melatonina e vincristina na dinâmica e na topologia de modelos de membranas compostos por fosfatidilcolina, através de técnicas instrumentais. Caracterizar as interações entre membranas e fármacos pode contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de ação dos últimos, bem como para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos mais eficazes no tratamento de doenças.

Com o objetivo de analisar a influência de melatonina em membranas, três modelos lipídicos foram utilizados: lipossomas, filmes de Langmuir e bicamadas suportadas em substrato sólido. Tais modelos apresentaram diferentes constituições lipídicas, que variaram em função do número de insaturações e estado de fase. A interação entre vincristina e membranas foi caracterizada em lipossomas, devido à importância da incorporação da vincristina em carreadores de liberação prolongada de fármacos.

A influência dos fármacos em regiões específicas de lipossomas foi descrita através de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de fluorescência e calorimetria de varredura diferencial (DSC). A partir da análise de espectros de RMN, foram calculados valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) para os núcleos ^{13}C e ^1H , de momentos espectrais de primeira ordem (M_1), parâmetros de ordem (S_{CD}) do núcleo ^2H , e anisotropia de deslocamento químico (C.S.A.) de ^{31}P , de forma a caracterizar a influência dos fármacos na dinâmica molecular dos lipídios. A topologia da membrana foi caracterizada a partir de estudos de variações de deslocamento químico ($\Delta\delta$) de ^1H , bem como de interações espaciais de ^1H intermoleculares (NOESY), obtidos através de RMN com e sem rotação no ângulo mágico (MAS). As medidas de fluorescência foram realizadas pelo monitoramento da sonda merocianina

540 (MC-540). Através da análise de curvas de DSC, foram obtidos valores de variação de entalpia das curvas endotérmicas dos lipídios.

O efeito da melatonina em filmes de Langmuir foi caracterizado através de medidas de variações na área molecular e de microscopia no ângulo de Brewster (BAM). A técnica de BAM permitiu a obtenção de medidas de variações de espessura da membrana.

As interações entre a melatonina e bicamadas lipídicas suportadas em mica foram observadas através de microscopia de força atômica (AFM) em modo contato.

Os resultados obtidos com RMN, fluorescência e DSC indicaram que a melatonina provocou um aumento na dinâmica molecular, um aumento na fluidez na região das cadeias laterais dos lipossomas. O fármaco pareceu afetar a região colina do grupo polar do lipídio, porém não demonstrou efeito considerável na região próxima ao grupo fosfato. Os resultados referentes aos estudos de topologia dos lipossomas sugeriram uma localização preferencial da melatonina na interface da membrana.

Em filmes de Langmuir, a presença de 0,22 mM de melatonina provocou um aumento na área total da membrana e reduziu a espessura da monocamada. Isto sugeriu que a melatonina incorporou e provocou um aumento da fluidez na monocamada lipídica.

A melatonina provocou um efeito diferente em fosfatidilcolina suportada em mica, quando comparado aos efeitos detectados nos outros modelos de membrana. Foi observado que a presença de melatonina na bicamada suportada provocou a inversão de predominância de fases dos lipídeos, do estado fluido para gel, a 28 °C, isto é, diminuiu a fluidez da membrana. Sugere-se que o efeito causado pela melatonina no sistema imobilizado pode ter sido influenciado pelas forças de interação entre a mica e a membrana.

Os estudos referentes ao efeito da vincristina em lipossomas sugeriram que este fármaco provocou um pequeno efeito de desordem na região apolar do lipídio. A localização preferencial do fármaco na região hidrofóbica da membrana, bem como sua afinidade pela membrana, também foram observadas.

As estratégias propostas neste trabalho permitiram caracterizar os efeitos da melatonina nos três modelos de membrana testados, obtendo-se informações sobre a influência deste fármaco em regiões específicas dos lipídios e associações com sua propriedade biológica como antioxidante. No que diz respeito à vincristina, as estratégias permitiram sugerir a localização preferencial da molécula, bem como seu efeito de desordem na membrana lipídica. Neste sentido, novas perspectivas de estudo foram levantadas para dar continuidade ao estudo com antitumorais.

ABSTRACT

In this work, instrumental strategies were proposed to characterize the effects of melatonin and vincristine on the molecular dynamics and topology of biological membranes. The characterization of the interactions between drugs and membranes allows a better understanding of the drugs mechanisms of action, and can contribute to the development of therapeutic advanced systems.

The effect of melatonin was investigated in phosphatidylcholine liposomes, Langmuir monolayer and mica supported membranes. The influence of vincristine was characterized in liposomes, due to the importance of this study in the drug therapeutic context.

The drugs influence in liposome specific regions was characterized through nuclear magnetic resonance (NMR), fluorescence spectroscopy, as well as by differential scanning calorimetry (DSC). NMR ^{13}C and ^1H longitudinal relaxation time (T_1), ^2H -NMR first spectral moment and chain order parameter, as well as ^{31}P chemical shift anisotropy (C.S.A.) analysis were used to characterize the effect of melatonin and vincristine in the lipid molecular dynamics. The drugs effect in the membrane topology was studied through “High resolution” magic angle spinning (HRMAS) ^1H -NMR, measuring chemical shift variations ($\Delta\delta$), as well as intermolecular special interactions (NOESY). The fluorescence experiments were performed following the behavior of the probe merocyanine 540. The analyses of DSC curves were performed through calculations of enthalpy variation values.

Melatonin influence in Langmuir monolayers was monitored through molecular area measurements and Brewster angle microscopy (BAM) images analysis.

The behavior of lipid bilayers supported on mica after the interaction with melatonin was investigated through atomic force microscopy (AFM) in the contact mode.

The results obtained suggested that melatonin can induce an increase in the liposomes non-polar chain mobility, as well as to interact with the choline polar region of the lipid. The analyses also suggested that melatonin presents a high affinity to the membrane and is inserted preferentially in the membrane interface.

In the work conditions, melatonin incorporation into POPC Langmuir monolayers, provoked an increase in the membrane total area, as well a reduction of the monolayer thickness. These results suggest that melatonin changed the phases of Langmuir monolayer to a more fluid state.

AFM images of mica-supported DMPC model indicated that, at work conditions, melatonin caused an inversion of lipid phase predominance from fluid to gel state. It is possible that the melatonin effect on lipid acyl chains had been influenced by the mica-membrane interaction forces.

Concerning the vincristine effects on liposomes, the results obtained demonstrated a small disordering effect of the drug on the membrane non polar region. It was also observed the vincristine preferential location in the membrane hydrophobic region.

Possible biological implications of our findings could be linked to the melatonin antioxidant properties in the membranes. With respect to the vincristine, the informations obtained about the interaction drug-membrane can contribute with the development of more efficient drug delivery systems.

CAPÍTULO I- INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

As membranas biológicas são responsáveis pela manutenção das características estruturais e funcionais das células eucarióticas. São consideradas como centro de regulação da atividade celular e são fundamentais para a conservação de processos energéticos celulares. As modificações em sua estrutura e propriedades, causadas pela interação com agentes internos ou externos, podem alterar ou eliminar suas atividades funcionais. Tais alterações estão associadas a várias doenças como as neurodegenerativas e o câncer ¹.

Muitos fármacos, tais como os antitumorais, apresentam a sua atividade terapêutica na membrana celular ^{2,3}. O conhecimento básico sobre as relações intermoleculares fármacos-membrana pode fornecer informações sobre os mecanismos de ação dos fármacos, bem como aprimorar o desenvolvimento de novas estratégias para o diagnóstico e tratamento de doenças humanas.

A grande variedade molecular presente nas membranas celulares dificulta a avaliação das influências de fármacos em suas propriedades ⁴. Entretanto, as interferências podem ser eliminadas através da utilização de modelos de membrana baseados em matrizes lipídicas. Estes modelos propiciam um maior controle sobre os componentes que podem influenciar o sistema estudado ^{4,5}. O uso de matrizes lipídicas também é interessante na preparação de sistemas de liberação prolongada de fármacos e de biosensores, visto que são menos tóxicas para o organismo, quando comparadas a outras matrizes, e formam um ambiente favorável à imobilização de estruturas biológicas como enzimas e anticorpos ^{6,7}.

Dentre os constituintes lipídicos presentes nos modelos de membrana, os fosfolipídios destacam-se por serem responsáveis pela estrutura e organização da

membrana celular. A fosfatidilcolina é o fosfolípido majoritário da membrana celular⁸. O comprimento da cadeia lateral, bem como o grau de insaturação de fosfatidilcolinas, pode influenciar processos biológicos, tais como a velocidade de lipoperoxidação da membrana por espécies reativas, seu estado de fase e a permeabilidade⁹.

A partir dessas informações, este trabalho visou caracterizar os efeitos do hormônio melatonina, conhecido por suas propriedades antioxidantes, e do antitumoral vincristina, em diferentes modelos de membranas lipídicas, de acordo com sua importância no contexto terapêutico¹⁰⁻¹².

Com a finalidade de obter maiores informações sobre a influência da interação entre a melatonina e a membrana no mecanismo de ação antioxidante da primeira, foram investigados os efeitos da melatonina nos seguintes modelos de membrana: i) bicamadas lipídicas sob a forma de lipossomas; ii) monocamadas de Langmuir; iii) bicamadas suportadas em substrato sólido. Os modelos de membrana foram caracterizados em cinco composições: i) fosfatidilcolina de ovo fresco (EPC, do inglês “egg phosphatidylcholine”); ii) uma associação entre EPC e palmitoil-oleoil fosfatidilcolina seletivamente deuterada em 31 posições de hidrogênio na cadeia acil (²H₃₁-POPC); iii) dimiristoil fosfatidilcolina seletivamente deuterada em 27 posições de hidrogênio na cadeia acil (²H₂₇-DMPC); iv) palmitoil-oleoil fosfatidilcolina (POPC) e v) dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). As composições diferem quanto ao estado de fase dos lipídios⁹.

Os estudos referentes aos efeitos da vincristina em membranas foram realizados em lipossomas, de forma a contribuir com o conhecimento fundamental sobre as interações fármaco-membrana. Este conhecimento pode ser aplicado no desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada na terapia antitumoral. Tal como

nos ensaios com melatonina, os lipossomas foram compostos por EPC, pela associação entre EPC e $^2\text{H}_{31}$ -POPC, e por $^2\text{H}_{27}$ -DMPC.

As alterações induzidas pelos fármacos nas propriedades físico-químicas das membranas foram caracterizadas através de diversas técnicas. Nos estudos com lipossomas, foram utilizados: i) a espectroscopia UV-visível; ii) a ressonância magnética nuclear (RMN) no estado líquido e no estado sólido; iii) a espectroscopia de fluorescência e iv) a calorimetria de varredura diferencial (DSC, do inglês Differential Scanning Calorimetry). O efeito de melatonina em filmes de Langmuir foi observado através de variações na área molecular da membrana e dados obtidos a partir de microscopia no ângulo de Brewster (BAM, do inglês Brewster Angle Microscopy). A interação entre a melatonina e as bicamadas suportadas em mica foi observada por microscopia de força atômica (AFM, do inglês Atomic Force Microscopy) ¹³⁻¹⁸. Desta forma, foram obtidas informações respectivas à influência dos dois fármacos na dinâmica molecular dos lipídios, bem como na topologia da membrana.

CAPITULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPITULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão bibliográfica inclui informações sobre: i) a influência da composição lipídica nas propriedades das membranas; ii) os diferentes modelos de membrana utilizados, iii) os fármacos-modelo usados no desenvolvimento do projeto e iv) as técnicas utilizadas para a caracterização das membranas antes e após a interação com os fármacos.

2.1. Influência da composição lipídica nas propriedades das membranas

A composição lipídica das membranas biológicas é fator determinante de propriedades, como o estado de fases e a permeabilidade, e de processos biológicos, tais como a velocidade de lipoperoxidação por espécies reativas^{9,19}.

Considerando o estado de fases das membranas, é importante ressaltar que a transição de fase principal corresponde à transição de uma bicamada lipídica na fase gel, ordenada e de mobilidade restrita, para a fase fluida, desordenada e com alto grau de mobilidade²⁰⁻²². A temperatura de transição de fase (T_m) é a temperatura na qual uma determinada amostra de membrana lipídica encontra-se 50% em estado gel e 50 % em estado líquido-cristalino¹⁵. As fosfatidilcolinas saturadas tais como a DMPC, formam estruturas com T_m elevadas. A T_m da DMPC é de 23,5°C, e no caso de DMPC seletivamente deuterada em uma de suas cadeias, 21°C²³. As fosfatidilcolinas insaturadas, tais como as originadas de fontes naturais (ovo ou soja) apresentam T_m negativa²⁴. Assim sendo, a presença de insaturações na cadeia acil dos lipídios está diretamente relacionada com o estado de fase das membranas.

Os lipídios poli-insaturados são alvos preferenciais de espécies reativas. A presença de hidrogênios bis-alílicos na cadeia lateral dos lipídios favorece o processo

de peroxidação da membrana. Neste processo, a etapa de iniciação pode ocorrer a partir da abstração de um hidrogênio da cadeia lateral. Os hidrogênios bis-alfícos estão mais suscetíveis à oxidação por espécies reativas, visto que apresentam sua energia de dissociação da ligação carbono-hidrogênio (75-80 kcal/mol) inferior às energias de hidrogênios alílicos ou alquil presentes na cadeia (88 e 101 kcal/mol, respectivamente). Desta forma, quanto maior o número de insaturações presentes na cadeia lateral dos lipídios, maior poderá ser o dano causado pela ação de espécies reativas ^{25,26}. Os rearranjos ou a perda das insaturações, durante o processo de peroxidação lipídica podem modificar a organização estrutural e empacotamento dos lipídios de membrana ^{27,28}.

Tem sido mostrado que o aumento de rigidez da bicamada lipídica pode acelerar a velocidade de peroxidação lipídica induzida por espécies reativas. Desta forma, diferentes composições lipídicas, ao influenciar o estado de fases da membrana, estão associadas de forma indireta à velocidade de lipoperoxidação ⁹.

Dentre as diferentes classes de lipídios, os fosfolipídios são responsáveis pela estrutura e organização da membrana celular. As fosfatidilcolinas são os fosfolipídios de constituição majoritária na membrana. Estes fosfolipídios possuem uma cabeça polar constituída por um grupo fosfocolina e duas cadeias de ácidos graxos de extensão similar entre si. Em geral, uma das cadeias apresenta-se saturada, enquanto a outra costuma possuir de uma a seis duplas ligações (Figura 1) ⁸.

As fosfatidilcolinas constituem majoritariamente as membranas das células sendo assim viáveis como constituintes de modelos de membrana. Por esta razão, são freqüentemente utilizadas nos estudos com lipossomas, filmes de Langmuir, e bicamadas lipídicas suportadas em substratos sólidos ²⁹⁻³¹.

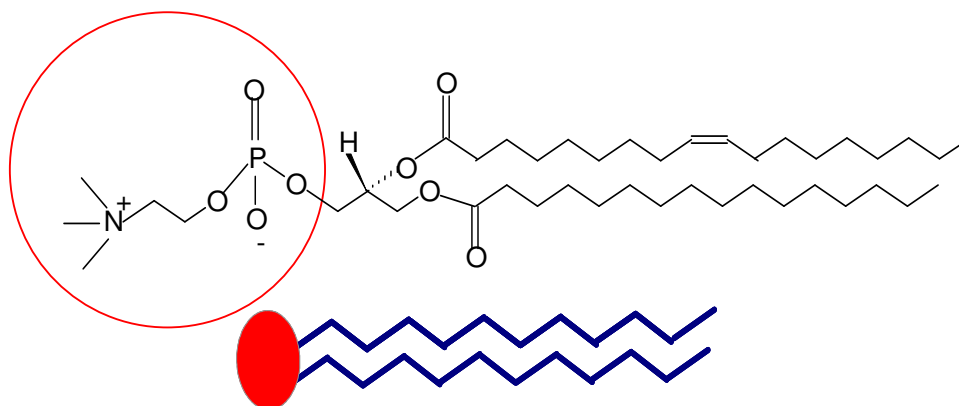


Figura 1- Representação estrutural e esquemática de uma molécula de fosfatidilcolina.

2.2. Modelos de membrana: lipossomas, filmes de Langmuir e bicamadas suportadas em substrato sólido

Os modelos de membrana foram escolhidos por diferirem na forma com a qual os lipídios estão organizados, permitindo identificar fatores intrínsecos que podem influenciar nas propriedades dos fármacos estudados. Desta forma, os modelos de membrana utilizados foram: i) lipossomas, estruturas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas, ii) filmes de Langmuir, lipídios organizados em monocamada disposta em interface ar-água, iii) bicamadas suportadas em mica muscovita.

2.2.1. Lipossomas

O uso de lipossomas é bastante difundido como modelo de estudo, devido a sua similaridade estrutural com a matriz lipídica de células e organelas ¹. Os lipossomas podem ser definidos como associações coloidais de lipídios anfipáticos, que se organizam em estruturas fechadas do tipo concha esférica ³². Estas associações possuem tamanhos e constituições variáveis que, juntamente com o método de preparação, são fatores determinantes de suas propriedades.

De acordo com o tamanho, os lipossomas podem ser classificados como: vesículas multilamelares grandes (MLV), vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV) (Figura 2). As MLV possuem um diâmetro superior a 400 nm e são compostas por uma ou mais lamelas (ou bicamadas) em seus compartimentos internos. Tais vesículas costumam ser preparadas a partir da dispersão de lipídios em meio aquoso, seguido de ciclos de congelamento-descongelamento para obter um tamanho uniforme³³. Já as LUV apresentam diâmetros na faixa de 50-400 nm e são organizadas em apenas uma bicamada. As LUV podem ser preparadas a partir da filtração sob pressão em filtros de polycarbonato de porosidade definida, processo conhecido como extrusão, a partir de uma amostra de MLV ou ainda sob ultrassom³³⁻³⁵. Adicionalmente, técnicas modificadas de hidratação, como procedimentos que envolvem a diálise de lipídios dissolvidos em surfactantes, podem ser utilizadas para formar LUV de uma forma direta, não originadas de MLV^{36,37}. As SUVs, por sua vez, possuem diâmetro na faixa de 20-50 nm e são mais instáveis em relação aos dois primeiros tipos de lipossomas³³.

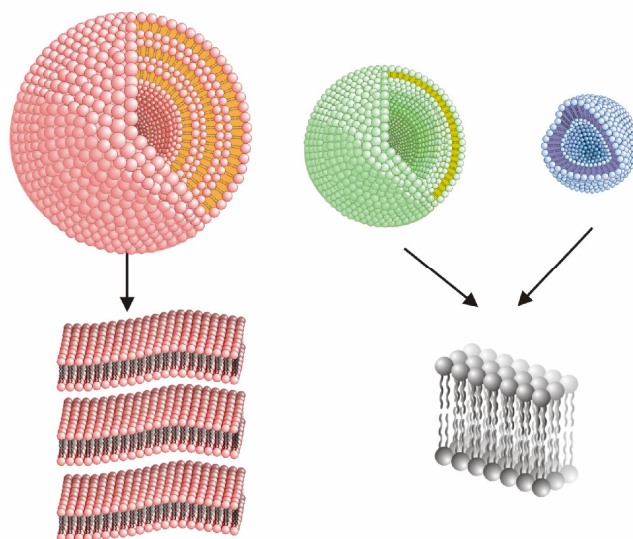


Figura 2 - Representação esquemática de MLV (esquerda), LUV (meio) e SUV (direita), e as respectivas bicamadas.

Os lipossomas são considerados como um sistema eficiente para a liberação controlada de fármacos há aproximadamente 40 anos, potencializando as características terapêuticas das substâncias ativas em função da biocompatibilidade e caráter anfipático, dentre outros fatores ^{38,39}. Relata-se também a importância de outras aplicações dos lipossomas nas áreas biomédicas (como testes diagnósticos, transfusões sanguíneas e desintoxicação através do uso de agentes quelantes), industriais, cosméticas (regeneração e hidratação do estrato córneo), agrícolas (estabilização de fertilizantes), pecuárias (maturação de laticínios) e em processos de purificação, de recuperação, de catálise ou de conversão de energia ^{40,41}.

2.2.2. Filmes de Langmuir

Os filmes de Langmuir podem ser definidos como filmes orgânicos finos orientados na interface entre uma subfase aquosa e uma fase gasosa ou líquida, para minimizar sua energia livre (Figura 3). Os filmes possuem a espessura correspondente a uma molécula, por isso são chamados de monocamadas, e são constituídos de moléculas anfifílicas, como os fosfolipídios ⁴². A parte hidrofóbica dos lipídios é responsável pela redução da solubilidade das moléculas na subfase aquosa, enquanto a parte hidrofílica proporciona o espalhamento do filme na superfície da água.

As monocamadas de Langmuir são geralmente preparadas dissolvendo-se o (s) lipídio (s) em um solvente orgânico e, em seguida, dispersando a amostra na superfície da água, ou tampão aquoso. A escolha do solvente orgânico é importante, este deve possuir baixa constante dielétrica. O solvente não deve evaporar de forma muito rápida, visto que isto induz a formação de defeitos no filme a ser formado ⁴³. Como exemplo destes solventes pode-se citar clorofórmio e metanol. Os filmes de Langmuir são produzidos em uma Cuba de Langmuir (ver sessão 2.4.4). Para formar as monocamadas,

a área superficial da subfase aquosa deve ser suficientemente extensa e/ou a quantidade de material espalhado ser suficientemente pequena. Quando a área superficial para o filme é diminuída, geralmente através da compressão do filme com uma barreira móvel, as moléculas interagem progressivamente formando o filme de Langmuir ⁴⁴.

Em um sistema de monocamadas, diversos parâmetros podem ser decididos, tais como a natureza e arranjo molecular dos lipídios, a composição da subfase e a temperatura. O uso de monocamadas de Langmuir como modelo de membrana também apresenta vantagens como a homogeneidade, estabilidade e geometria planar das moléculas de lipídios, que possuem uma orientação específica ⁴⁴. Este modelo pode simular a metade de uma membrana, podendo ser utilizado para estudar interações intermoleculares em sua superfície ⁴⁵⁻⁴⁷. A subfase aquosa também pode ser modulada para simular condições fisiológicas de células e hidratação das cabeças polares.

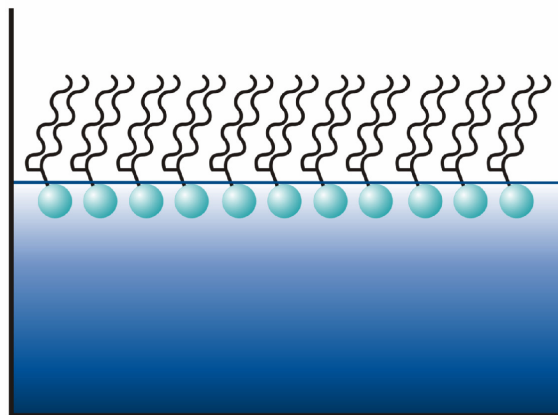


Figura 3 - Representação de um filme de Langmuir, formado por lipídios em uma subfase aquosa.

Por outro lado, um dos detalhes a considerar é a organização assimétrica associada à espessura da membrana, que se apresenta como duas vezes menor que a espessura das membranas naturais ¹⁸.

O uso de fosfolipídios pode propiciar a formação de monocamadas estáveis em uma faixa de temperatura extensa. Em determinadas temperaturas, estes lipídios demonstram uma fase análoga à gasosa (G), apresentando grandes valores de área molecular. Com a compressão dos lipídios pela barreira móvel, pode-se observar a formação da fase líquido-expandida (LE), de alta compressibilidade, e da fase líquido-condensada (LC), de compressibilidade menor que a primeira. As duas fases apresentam alta ordem molecular, podendo também co-existirem. Com a redução progressiva da área molecular, observa-se a fase sólida (S), tal como a de um cristal bi-dimensional. A medida que a compressão prossegue e a área superficial diminui, o ordenamento cristalino é perturbado, causando um colapso, e diferentes organizações moleculares podem ser observadas na monocamada. No colapso, o desdobramento do filme pode dar lugar a agregados, dissolução na subfase, bicamadas ou multicamadas, dentre outros. As fases descritas podem ser detectadas em uma isoterma de pressão versus área, tal como a demonstrada na figura 4.

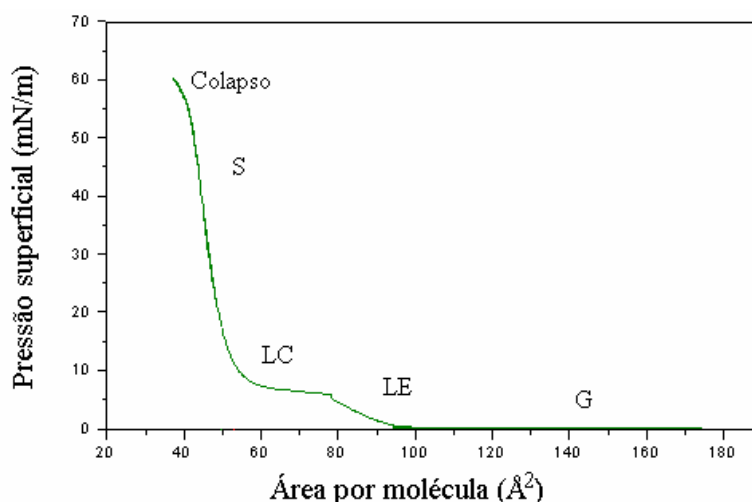


Figura 4- Isoterma de pressão de superfície para um filme do DPPC puro e as fases estruturais correspondentes às diferentes regiões de compressão do filme (S, sólida; LC, líquido-condensada; LE, líquido-expandida; G, gasosa).

A interação de um fármaco com as monocamadas de Langmuir pode ser caracterizada por técnicas aplicadas à superfície de uma membrana, tais como os estudos de variações de pressão e área superficial; e por técnicas ópticas, tal como a microscopia no ângulo de Brewster, que permite a determinação da espessura da membrana^{44,48,49}. Esta última está descrita adiante, na sessão 2.4.5.

2.2.3. Membranas suportadas em substrato sólido

As membranas suportadas em substratos sólidos (Figura 5) foram desenvolvidas para aumentar o grau de estabilidade de outros modelos de membrana lipídicos, tanto em estudos fundamentais como em aplicações práticas⁵⁰. Tal modelo de membrana permite: i) a preparação de filmes ultrafinos, de alta resistência; ii) a obtenção de filmes com orientação bem definida, quando suportados em metais e semicondutores, e iii) a incorporação de proteínas e fármacos para o desenvolvimento de biosensores usando métodos elétricos de detecção⁵¹.

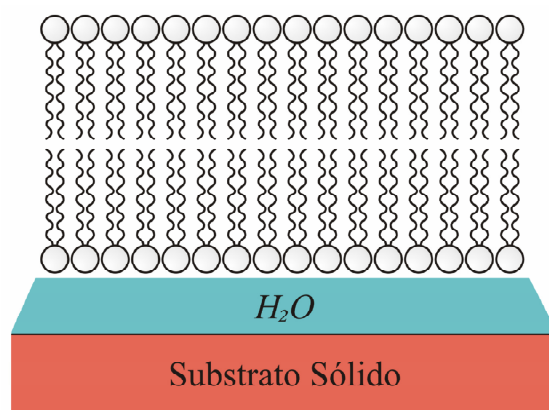


Figura 5 - Representação esquemática de uma bicamada suportada em substrato sólido.

As bicamadas lipídicas suportadas podem ser preparadas de forma relativamente rápida, com controle da composição da amostra. Uma camada de água de cerca de 2 nm forma-se entre o suporte sólido e a bicamada lipídica, preservando a fluidez e as transições de fase das bicamadas suportadas ^{52,53}.

As bicamadas lipídicas podem ser depositadas de diversas formas no substrato sólido e, dentre essas, a fusão de vesículas é frequentemente utilizada por sua simplicidade e viabilidade ⁵⁴. A formação de bicamadas suportadas (Figura 6) envolve a adesão da vesícula e ruptura, seguida por fusão das bicamadas, controladas por três tipos de força de interação entre as vesículas e o substrato: i) a força atrativa de van der Waals, ii) a força da bicamada eletrostática, e iii) a força de solvatação da água ^{55,56}.

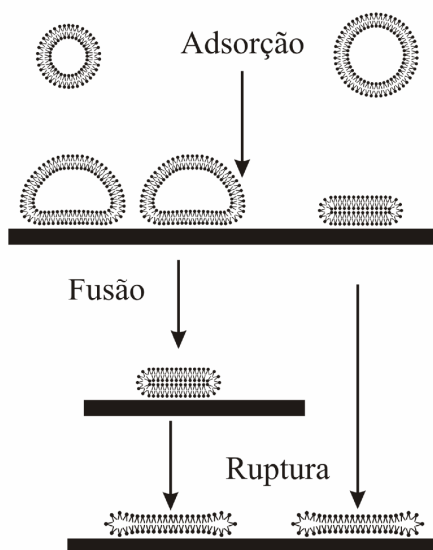


Figura 6 - Representação esquemática das etapas associadas à fusão de vesículas em um substrato sólido.

O mecanismo de formação das bicamadas suportadas depende das características físico-químicas das vesículas, tais como o raio (R), os raios críticos de adsorção, de

fusão e de ruptura, bem como o seu potencial efetivo de contato. As relações entre estes fatores determinam os processos de adsorção, fusão e de ruptura da vesícula no substrato sólido. Tais fatores determinam também a forma na qual a vesícula é adsorvida, como por exemplo, na forma de “panquecas”, ou de estruturas com extremidades esféricas, como demonstradas na figura 6 ⁵⁷.

O processo de adsorção e organização dos lipídios em um substrato sólido também dependerá da natureza deste último, como descrito a seguir.

2.2.3.1. Mica muscovita como substrato para bicamadas de fosfatidilcolina

A análise de bicamadas lipídicas suportadas em substrato sólido, através de técnicas de microscopia, requer que o substrato, preferencialmente: i) seja relativamente regular em nível atômico, de forma a prevenir interpretações incorretas sobre a topografia da amostra, e ii) possua afinidade com as moléculas estudadas, permitindo sua adsorção, preservando total ou parcialmente as atividades funcionais da amostra ⁵⁸.

A mica muscovita é composta por camadas de $(\text{SiAl})_2\text{O}_5$ ligadas por interações iônicas a uma camada central de $\text{Al}_2(\text{OH})_2$ (Figura 7). A carga líquida negativa resultante interage com a carga de K^+ . A camada assim formada de K^+ permite uma fácil clivagem do substrato, o que resulta em uma superfície limpa, hidrofílica e regular em nível atômico para suportar as amostras. Quando imersa em soluções aquosas, a mica muscovita apresenta carga de superfície negativa, permitindo fácil adsorção de lipídios com carga de superfície positiva. Adicionalmente, a adsorção de estruturas com carga de superfície positiva pode ser facilitada pela presença de cátions bivalentes, tais como Mg^{2+} , que atuam como intermediários na interação entre a superfície da amostra e a do substrato ⁵⁹.

Para o caso de bicamadas fosfolípicas, em especial fosfatidilcolina, o substrato de mica muscovita estabelece uma forte adesão através de interações eletrostáticas, sendo assim o mais freqüentemente utilizado como suporte ^{60,61}.

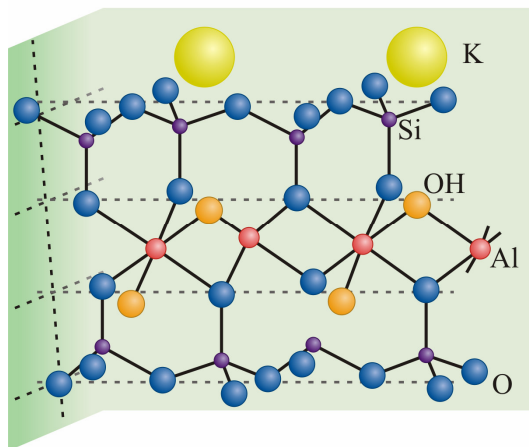


Figura 7 - Estrutura de mica muscovita.

2.3. Fármacos a serem testados: melatonina e vincristina

Neste trabalho, a melatonina e a vincristina foram utilizadas como fármacos-modelo, e suas diferentes formas de interação com os modelos de membranas foram avaliadas através de várias técnicas instrumentais, descritas adiante.

2.3.1. Melatonina

A melatonina (N-acetil-2-metoxitriptamina) é um neurohormônio cuja síntese ocorre principalmente na glândula pineal, a partir do metabolismo do triptofano ⁶². A melatonina atua como um mediador químico que regula diversos processos celulares fisiológicos neuroendócrinos e controla determinados fatores circadianos neurais, bem como funções imunes ^{63,64}. A melatonina pode ser aplicada no tratamento de distúrbios

no ritmo circadiano, AIDS, cataratas, doenças cardíacas, mal de Alzheimer e câncer ⁶⁵⁻

⁷¹. A estrutura da melatonina está apresentada na figura 8.

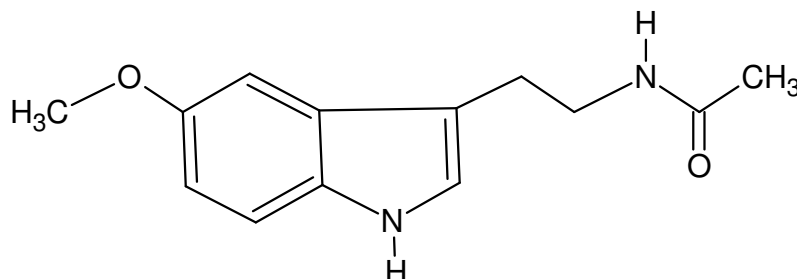


Figura 8 - Estrutura da melatonina (N-acetil-metoxitriptamina).

A melatonina tem sido considerada uma espécie antioxidante potente contra os efeitos danosos provocados pelo estresse oxidativo no organismo ¹. Este neurohormônio pode atuar através do seqüestro de uma variedade de espécies reativas tais como radical hidroxil, peroxinitrito, oxigênio singlete e monóxido de nitrogênio ^{72,73}. Neste contexto, também foi descrito que a melatonina pode estimular enzimas antioxidantes, inibir enzimas pró-oxidantes e inibir processos de oxidação catalisados por íons metálicos ⁷⁴⁻⁷⁶.

Há evidências de que os efeitos antioxidantes da melatonina sejam regulados por sua capacidade de alterar a fluidez da membrana. Entretanto, são poucos os estudos relativos ao efeito da melatonina em membranas biológicas, e a maioria destes está associada a ensaios em lipossomas contendo lipídios saturados ⁷⁷⁻⁷⁹. Aparentemente, alguns destes estudos apresentaram respostas contraditórias entre si. Costa e colaboradores ⁷⁷ sugeriram, através de ressonância paramagnética eletrônica, uma redução na dinâmica lipídica de lipossomas contendo DMPC, após a interação do mesmo com melatonina. Entretanto, estudos realizados com calorimetria de varredura

diferencial (DSC) por Saija e colaboradores ⁷⁸, demonstraram que a melatonina pode aumentar o grau de mobilidade da membrana. Por estas razões, além das propriedades físico-químicas da melatonina, como solubilidade e lipofilicidade, a melatonina torna-se interessante para a abordagem experimental proposta neste trabalho.

2.3.2. Vincristina

A vincristina (Figura 9) é um alcalóide dimérico encontrado na vinca (*Vinca rosea L.*), pertencente à classe dos antitumorais mais utilizados atualmente ⁸⁰. Sua atividade citotóxica está baseada na habilidade de inibir a dinâmica e arranjo de microtúbulos, inibindo o crescimento da célula tumoral durante a metáfase, estágio importante da divisão nuclear da célula ⁸¹⁻⁸³.

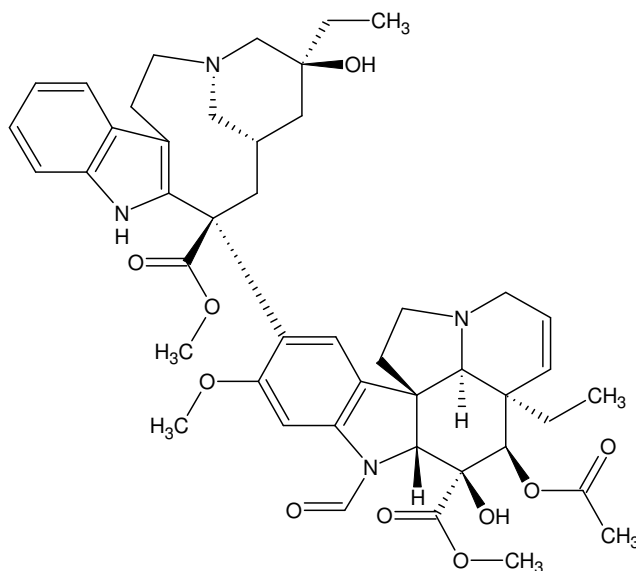


Figura 9 - Estrutura da vincristina.

Devido ao fato da vincristina atuar exclusivamente durante a metáfase, a exposição dos sítios tumorais ao fármaco durante longos períodos de tempo pode tornar-se uma grande vantagem na terapia anti-cancer. Assim sendo, mais células tumorais

estariam expostas ao fármaco durante o ciclo celular sensível ao mesmo. Uma forma de prolongar o tempo de exposição das células cancerosas ao fármaco é incorporá-lo em carreadores para liberação prolongada no organismo, como os lipossomas⁸⁰⁻⁸⁵.

A incorporação de vincristina, uma base fraca, em lipossomas pode ser realizada através da promoção de um gradiente de pH. Neste procedimento o meio interno do lipossomo deverá apresentar pH ácido enquanto o meio externo deverá possuir pH neutro. Desta forma, o meio externo ao lipossomo conterá a vincristina em suas formas protonada e não-protonada. A vincristina em sua forma protonada é impermeável à membrana. Já a vincristina em sua forma não protonada pode difundir através da mesma até o momento em que as concentrações do composto alcancem o equilíbrio no meio interno e externo do lipossomo. Entretanto, se o pH no interior da vesícula for ácido, a protonação do composto irá conduzir a incorporação da vincristina dentro do lipossoma⁸⁶, conforme representado na figura 10.

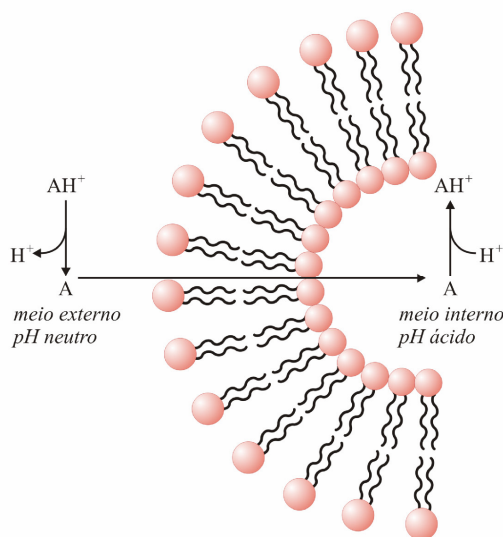


Figura 10 - Representação esquemática da incorporação de vincristina em lipossomas através de “gradiente de pH”.

A importância terapêutica da caracterização do efeito e localização de vincristina nos lipossomas foi um fator determinante na escolha deste fármaco como modelo para este trabalho.

2.4. Técnicas instrumentais utilizadas para caracterização de membranas

Neste trabalho, a caracterização das propriedades físico-químicas dos modelos de membrana foi realizada através de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de fluorescência, calorimetria de varredura diferencial (DSC), experimentos em cuba de Langmuir, microscopia no ângulo de Brewster (BAM) e microscopia de força atômica (AFM).

2.4.1. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os fundamentos teóricos da técnica de RMN baseiam-se no princípio de que em um campo magnético externo aplicado (B_0), núcleos que possuem momentos magnéticos podem absorver uma radiação eletromagnética em determinada região de radiofrequência. Tal frequência é determinada através da equação:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma) \quad [1]$$

na qual γ é a razão magnetogírica do núcleo, B_0 é o campo aplicado e σ , a constante de blindagem.

A quantidade de radiação eletromagnética que os núcleos absorvem é dependente da interação entre o campo magnético externo e o campo magnético provocado pelo giro dos elétrons ao longo do eixo nuclear⁸⁷⁻⁸⁹.

Os espectrômetros de RMN mais utilizados atualmente são os denominados aparelhos de pulso com transformada de Fourier. Nestes aparelhos, um núcleo

submetido a um forte campo magnético externo recebe e absorve energia sob a forma de fótons. Os pulsos de radiação de radiofrequência são irradiados após intervalos de tempo, denominado intervalo entre pulsos. Durante este intervalo, um sinal de radiofrequência de domínio temporal, denominado decaimento de indução livre (FID), é emitido a partir da relaxação do núcleo excitado. Este sinal é detectado por uma bobina receptora de radiofrequência, digitalizado e armazenado em um computador para tratamento de dados. Por aplicação da transformada de Fourier, o FID é convertido em um sinal de domínio de frequência, que é apresentado no espectro de RMN (Figura 11).

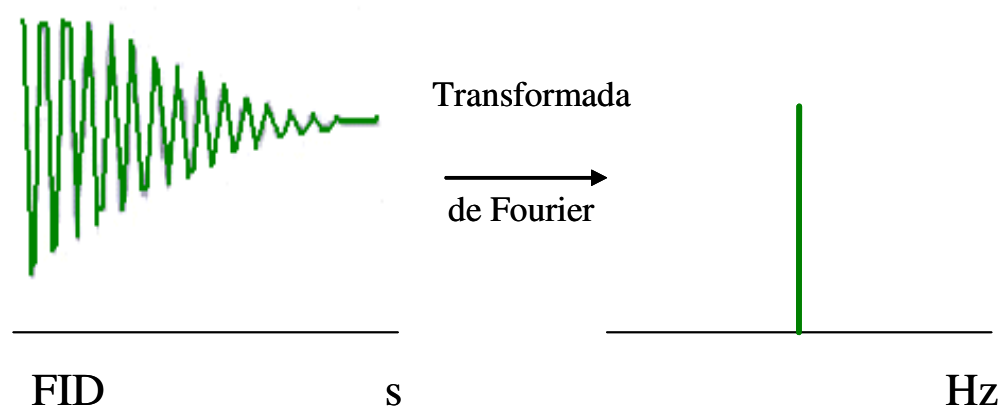


Figura 11 - Sinal de FID e sinal de domínio de frequência obtido depois de aplicar a transformada de Fourier.

A técnica de RMN pode ser ajustada para experimentos com amostras no estado líquido ou no estado sólido.

2.4.1.1. RMN para amostras no estado líquido

O espectro de RMN no estado líquido é caracterizado por bandas finas, de intensidade variável, ao longo de um eixo de frequência. A amostra deve estar completamente dissolvida na solução, pois a presença de agregados na amostra causaria

o alargamento das bandas de ressonância, interferindo na interpretação do espectro. Os experimentos de RMN com amostras no estado líquido permitem determinar a estrutura molecular de uma substância, através da obtenção de parâmetros como deslocamento químico (δ), multiplicidade ou constante de acoplamento escalar spin-spin (J) e intensidade da banda de ressonância, ou ainda, a proporção de diferentes espécies em misturas de substâncias ^{87,90}.

O deslocamento químico (δ) pode ser definido como o grau de blindagem de um núcleo pelo campo magnético em oposição, que por sua vez é causado pela nuvem eletrônica ao redor do núcleo. O grau de blindagem é diretamente proporcional à densidade da nuvem eletrônica presente em torno do núcleo. A densidade da nuvem eletrônica, por sua vez, varia em função do ambiente químico no qual o núcleo está inserido. O fenômeno de desblindagem é resultante de interações entre o núcleo e o seu ambiente químico, que reduzem a densidade da sua nuvem eletrônica.

Outros fatores podem influenciar o δ de um núcleo, como o solvente utilizado durante o experimento, o pH, a temperatura do meio no qual a amostra se encontra, a concentração e a sua interação com reagentes de deslocamento.

O δ pode ser quantificado em unidades de frequência (Hz) ou em unidades adimensionais, caso seu valor em Hz seja dividido pela frequência aplicada no núcleo (em MHz) e multiplicado por 10^6 . As unidades adimensionais do δ são expressas no espectro de RMN como partes por milhão (ppm). No espectro de RMN o δ pode estar direcionado para regiões espectrais mais blindadas, à direita do espectro, conhecidas como “campo alto”, ou para regiões menos blindadas, à esquerda do espectro, denominadas “campo baixo” ⁹¹.

Outro fenômeno importante a ser considerado, associado à RMN, é a constante de acoplamento escalar spin-spin (J). Um sinal de RMN de um núcleo pode desdobrar-

se em multipletos, em função da interação eletrônica do núcleo com os núcleos vizinhos. O número de desdobramentos de um sinal de RMN corresponde à relação $2nI + 1$, na qual n é a quantidade de núcleos que interage com o núcleo correspondente ao sinal e I é o número quântico de spin. Por exemplo, um hidrogênio que interage com outros três hidrogênios metílicos dará origem a um quarteto como sinal de RMN ⁸⁹. Desta forma, é possível conhecer a quantidade de núcleos vizinhos a determinado núcleo, facilitando a interpretação do espectro de acordo com a estrutura de um composto analisado.

Outra característica da técnica que facilita a interpretação do espectro é o fato de que a intensidade da banda de ressonância, correspondente a área do sinal, é diretamente proporcional à quantidade de núcleos que contribuem para a formação do sinal. Tal relação é possível quando o intervalo entre as aquisições do FID for maior ou igual a 5 vezes o tempo de relaxação longitudinal (T_1) do núcleo ⁸⁷.

O processo de relaxação caracteriza a redistribuição, pelo sistema de spin nuclear, do excesso de energia originado da aplicação de um pulso de radiofrequência, com a finalidade de retornar ao estado de equilíbrio térmico. Há dois tipos importantes de processos de relaxação em RMN, que ocorrem simultaneamente: i) o T_1 , em que o retorno ao estado de equilíbrio ocorre através da transferência do excesso de energia do sistema spin para a rede molecular adjacente ao núcleo e, ii) relaxação spin-spin ou transversal (T_2), em que não ocorre uma variação de energia da amostra, tampouco uma transição entre níveis de energia, mas ocorre uma redução na quantidade de organização. Em outras palavras, a entalpia permanece constante e a entropia aumenta ⁸⁷.

Neste trabalho, foram realizadas medidas de T_1 para obterem-se informações sobre a dinâmica lipídica dos lipossomas. Maiores detalhes serão descritos a seguir.

2.4.1.1.1. Medidas de T_1 em membranas

Em um estudo com membranas, as medidas de T_1 podem ser úteis na análise das alterações na mobilidade molecular das cadeias carbônicas apolares lipídicas^{92,93}. Os valores de T_1 estão relacionados ao tempo de correlação (τ_c), definido como o tempo médio que uma molécula leva para girar em 1 radiano⁸⁷. O esquema apresentado na figura 12 demonstra dados típicos que podem ser obtidos ao determinarem-se valores de T_1 em função da temperatura. Observa-se que os valores de T_1 em função de τ_c se comportam como um “V”, no qual o valor de τ_c no ponto mínimo pode ser obtido diretamente do valor de ω_0 . O ponto mínimo da curva (onde $\omega\tau_c = 1$) determina os regimes de alta e baixa mobilidade. Para obterem-se informações sobre a dinâmica lipídica é necessário saber se os valores de τ_c estão acima ou abaixo do mínimo da curva. Por exemplo, no caso de MLV, pode-se considerar que a redução de valores de T_1 corresponde a um menor valor de τ_c , isto é, a um aumento do grau de mobilidade molecular⁹⁴.

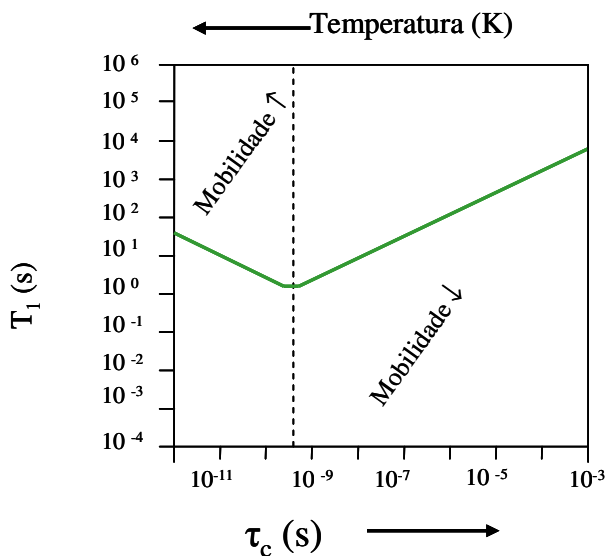


Figura 12 – Representação esquemática da relação típica entre tempo de relaxação longitudinal (T_1) e o tempo de correlação (τ_c).

A relaxação de ^{13}C e ^1H ocorre predominantemente através de interações dipolares flutuantes envolvendo a vizinhança do núcleo de ^1H ^{95,96}. Dentre as dinâmicas moleculares que contribuem para o T_1 de ^{13}C , estão incluídas as rotações internas das cadeias acil, tais como torções e vibrações⁹². O T_1 de ^1H está associado a contribuições de todos os núcleos do lipídio, especialmente dos metilenos da cadeia alifática. Em fosfatidilcolinas, a região da cadeia apresenta 70% do total de ^1H presentes na molécula⁹³.

2.4.1.2. RMN para amostras no estado sólido

Os experimentos com RMN para amostras no estado sólido permitem a análise da ordem estrutural local, conformação, mobilidade e da distribuição de orientações de núcleos em relação ao campo magnético. Em membranas, a técnica de RMN pode fornecer informações importantes no que diz respeito a mudanças específicas na organização e propriedades da estrutura lipídica.

Dois tipos de espectros podem ser obtidos a partir da técnica de RMN para amostras no estado sólido: o chamado estático ou “wide line” e o obtido com rotação da amostra no ângulo mágico (magic angle spinning- MAS, em inglês).

Os espectros do tipo estático são sensíveis à simetria da membrana e movimentos moleculares, sendo usados para determinar a natureza das fases da membrana e monitorar a dinâmica molecular. As membranas em estado fluido apresentam movimentos moleculares lentos e anisotrópicos. Conseqüentemente, as bandas de ressonância podem ser alargadas de vários milhares de Hz, caracterizando o chamado “padrão de pó”, e vão depender da orientação das moléculas em relação ao campo magnético, de acordo com a equação

$$\omega = \omega_{\text{iso}} + A \frac{(3 \cos^2 \theta - 1)}{2} S \quad [2]$$

Onde ω é a frequência da banda de ressonância, ω_{iso} é a frequência isotrópica, θ é o ângulo entre o eixo de maior mobilidade rotacional e o campo magnético externo aplicado (B_0), e S , o parâmetro de ordem. A constante “A” depende da interação magnética predominante que, no caso de membranas e seus estados de fase, podem ser: i) interação dipolar, ii) interação quadrupolar, para núcleos com $I > 1/2$ e iii) anisotropia de deslocamento químico. Tais interações podem alargar a banda de ressonância em milhares de Hz ^{94,97}.

Os efeitos provocados por fármacos na dinâmica molecular referentes à cabeça e cauda dos lipídios podem ser observados através de experimentos de RMN de ^{31}P e de ^2H , respectivamente ^{98,99}. No que se refere à RMN de ^2H , as alterações provocadas pelos fármacos no parâmetro de ordem, momentos espectrais e T_m dos lipídios podem também ser monitoradas ¹⁰⁰.

A rotação no ângulo mágico (MAS) corresponde à técnica na qual o rotor contendo a amostra gira em frequências na ordem de vários kHz no ângulo de $54,7^\circ$ (conhecido como “ângulo mágico”) em relação a B_0 . A MAS propicia a obtenção de um espectro com linhas finas bem definidas, ao invés de sinais anisotrópicos tipicamente largos, observados em espectros de RMN do tipo estático ¹⁰¹. Isto porque a rotação do rotor no ângulo mágico, em velocidades de vários kHz, cancelaria o item dependente do ângulo descrito na equação 2, deixando o espectro com os termos presentes em um espectro típico de uma amostra no estado líquido, como o deslocamento químico e a multiplicidade.

O grau de redução da largura das bandas de ressonância depende de vários fatores. Porém, há uma regra geral que pode ser adotada: a velocidade de rotação deve possuir um valor (em kHz) maior do que a largura provocada pelas interações intrínsecas ao estado sólido em um espectro de RMN estático.

Espectros multidimensionais de RMN, como a espectroscopia de efeitos Overhauser nuclear (NOESY), podem fornecer informações sobre as interações espaciais entre a substância incorporada na membrana e os lipídios, e conseqüentemente, sobre a estrutura tridimensional e topologia da estrutura lipídica. A espectroscopia NOESY de ^1H mede a transferência de magnetização entre hidrogênios de uma amostra através do espaço, podendo fornecer pistas sobre as interações intermoleculares entre os hidrogênios de um composto determinado e da membrana em distâncias de até 5\AA ¹⁰².

2.4.1.2.1. Estudos de dinâmica lipídica – RMN do tipo estático (ou “wide line”) de ^2H e de ^{31}P

As influências causadas por agentes internos e externos na cadeia alifática dos lipídios também podem ser analisadas através de RMN de ^2H . Esta é considerada uma técnica não-invasiva que descreve em tempo e espaço a ordem de orientação dos lipídios que possuem cadeias acil seletivamente deuteradas. Através de RMN de ^2H , podem ser obtidas informações referentes ao parâmetro de ordem das cadeias seletivamente deuteradas (S_{CD}), bem como a T_m dos lipídios.

O S_{CD} pode ser calculado a partir de medidas do desdobramento quadrupolar, $\Delta\nu_Q$, nas moléculas que estão orientadas em 90° em relação a normal da bicamada^{99,100}.

$$|\Delta\nu_Q(90^\circ)| = \frac{3}{4} A_Q |S_{\text{CD}}| \quad [3]$$

Em que A_Q representa a constante de acoplamento quadrupolar estática, que corresponde a 167 kHz para ligações carbono-deutério¹⁰³. Os valores de $\Delta\nu_Q$ podem ser

obtidos diretamente do espectro de RMN de ^2H de uma amostra, medindo-se as distâncias entre os dubletos quadrupolares (Figura 13) ^{104,105}.

No caso de MLV, pelo fato de tais vesículas não se orientarem em função do campo magnético, o espectro destas vesículas representa a soma de todas as orientações possíveis da bicamada (Figura 12). Desta forma, um espectro de RMN de ^2H de MLV contendo lipídios seletivamente deuterados representa a superposição de espectros originados de ligações individuais carbono-deutério não equivalentes. Por exemplo, no caso de $^2\text{H}_{31}$ -POPC, quando em fase fluida, o deutério ligado a cada um dos carbonos da cadeia possui um parâmetro de ordem diferente. Logo, o espectro de RMN de ^2H resultará em uma superposição de 15 espectros diferentes (referentes aos 15 tipos de deutérios na cadeia), o que dificulta sua interpretação ¹⁰⁶. Para facilitar a interpretação do espectro, obtendo-se valores S_{CD} correspondentes a cada posição dos carbonos presentes na cadeia seletivamente deuterada lipídica, utiliza-se o procedimento de deconvolução espectral, ou “de-Pake-ing”. Tal procedimento matemático reconstitui um espectro orientado em um ângulo específico (em geral, 90° em relação ao campo magnético), a partir do original ^{107,108}.

É importante considerar que o S_{CD} aumenta a partir do carbono terminal da cadeia alifática em direção a região glicerol do lipídio.

A análise de espectros de RMN de ^2H em função da temperatura permite a obtenção de uma estimativa global da ordem de toda a cadeia lipídica. Isto pode ser realizado a partir de cálculos dos momentos espectrais ¹⁰⁹⁻¹¹⁰. No caso de espectros simétricos a partir de um eixo axial, os momentos espectrais de primeira ordem (M_1) podem ser usados para estimar o parâmetro de ordem médio da cadeia lipídica ¹¹¹:

$$\langle S_{\text{CD}} \rangle_{\text{cadeia}} = \frac{\sqrt{3}}{\pi A_Q} M_1 \quad [4]$$

Desta forma, os momentos espectrais podem ser usados para caracterizar o estado de fases de membranas biológicas^{112,113}. A partir do estudo de variação térmica de M_1 pode-se determinar a T_m (Figura 14). A obtenção do valor de T_m através de medidas de M_1 torna-se possível a partir do ponto em que a transição de fase sólido-ordenada para fluida é marcada por um decréscimo dos valores de M_1 , à medida que a temperatura aumenta na região de transição¹¹⁴. Tal decréscimo indica a perda gradual da ordem de orientação de cadeias acil na fase fluida e o aumento da rotação molecular simétrica no eixo axial¹¹⁵. Nota-se ainda, na figura 14, que o espectro de ^2H RMN de lipídios na fase fluida é caracterizado por um aumento do grau de simetria axial.

As alterações induzidas por substâncias localizadas na região polar dos lipídios podem ser analisadas a partir da observação das bandas de ressonância do núcleo fósforo (^{31}P). Tal núcleo é considerado como uma boa sonda para analisar movimentos e estrutura da cabeça lipídica, uma vez que representa um sistema isolado de spin $I = \frac{1}{2}$, sujeito as interações dipolares (próton-fósforo ^1H - ^{31}P) e de anisotropia de deslocamento químico^{98,116}. A anisotropia de deslocamento químico pode ser utilizada para avaliar as restrições impostas na região onde está presente o núcleo avaliado. Desta forma, um núcleo ^{31}P com alto grau de mobilidade apresentará uma banda de ressonância fina, e um baixo valor de C.S.A., enquanto que um núcleo ^{31}P com mobilidade restrita apresentará uma banda alargada e um alto valor de C.S.A.^{117,118}.

Face ao exposto, a caracterização das interações membranas-fármacos foi efetuada através da análise das alterações provocadas nos valores de parâmetros de ordem, momentos espectrais, T_m dos lipídios, anisotropia do deslocamento químico, bem como determinação das interações diretas e espaciais intra e intermoleculares.

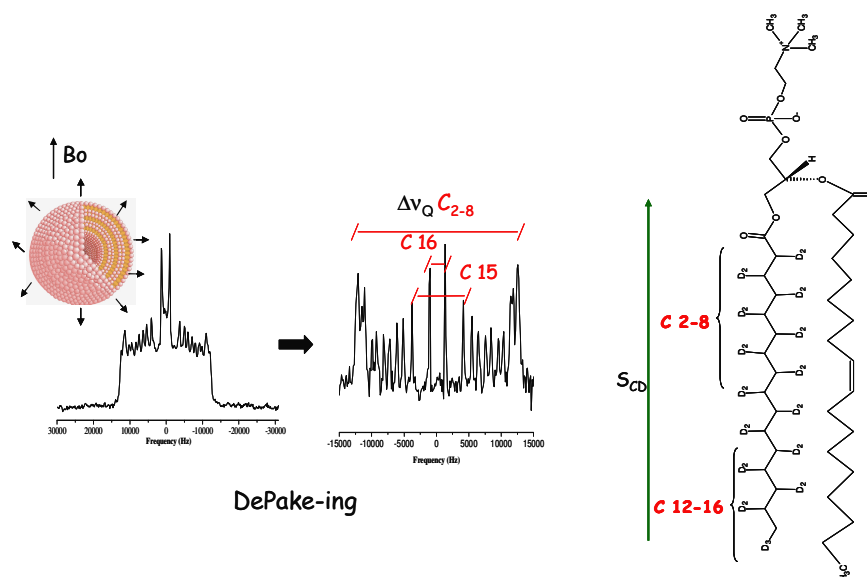


Figura 13 - Espectro de RMN de ^2H antes e após o De-Pake-ing, e associações entre os dubletos quadrupolares e as posições dos carbonos deuterados na cadeia lipídica.

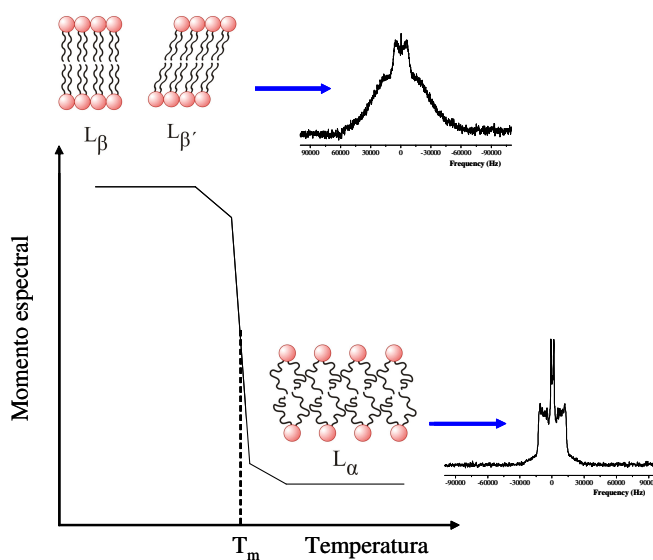


Figura 14 – Representação esquemática da redução dos valores de momentos espectrais em função da temperatura, caracterizando a transição de fase sólido-ordenada (L_β , $L_{\beta'}$) para fluida (L_α).

2.4.2. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência baseia-se na absorção molecular de um fóton, cuja energia é correspondente a diferença entre o estado eletrônico fundamental e um dos estados eletrônicos excitados da molécula. Após sofrer um período de excitação, os elétrons retornam do primeiro estado de excitação ao seu estado fundamental, emitindo energia em forma de luz ¹¹⁹. A intensidade de emissão pode ser detectada em função de comprimentos de onda fixos, através de espectrofluorímetros ⁹¹.

Através da espectroscopia de fluorescência, é possível obter informações sobre o arranjo, ou empacotamento, molecular de membranas, a partir da mobilidade de uma sonda inserida em determinado local da bicamada ¹²⁰⁻¹²².

Os estudos de fluorescência relativos ao efeito de fármacos na dinâmica lipídica em membranas estão geralmente associados à partição do fármaco no meio aquoso/lipídico. Para a maioria dos casos, tal partição pode ser analisada das seguintes formas: i) por diferenças em parâmetros de fluorescência do fármaco, como a anisotropia de fluorescência, quando presente em meio aquoso ou na membrana, ou ii) modificações em determinada propriedade fluorescente de uma sonda incorporada na membrana, após interação membrana-fármaco ¹²³.

Para estudos de efeitos de fármacos em lipossomas, o uso da sonda merocianina-540 (MC-540) (Figura 15) torna-se interessante devido ao aumento da intensidade de fluorescência emitida quando a sonda está presente em lipídios com maior grau de espaçamento entre si, como no caso de membranas em estado mais fluido ¹²⁴⁻¹²⁶.

Ao ligar na superfície da bicamada, a MC-540 permanece localizada na região do grupo glicerol ^{125,126}. A ligação de MC-540 pode ser determinada a partir das razões de intensidade de fluorescência a 580 e 565 nm. Tais intensidades correspondem a

maior emissão de monômeros de MC-540 ligados à superfície (580 nm) e livres no meio aquoso (565 nm) ¹²⁷.

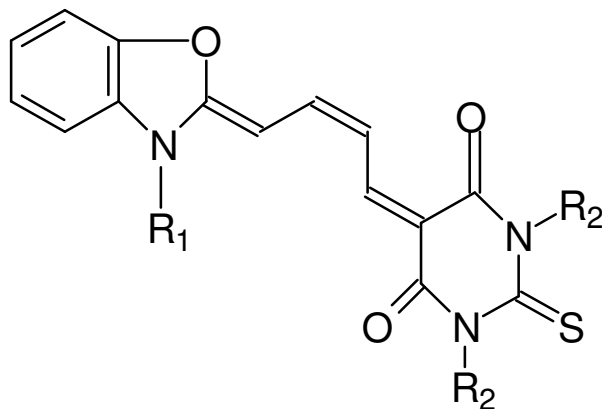


Figura 15 - Estrutura da merocianina 540. $R_1 = (CH_2)_3SO_3^-Na^+$; $R_2 = (CH_2)_3CH_3$.

A partir dessas informações, a sonda MC-540 foi utilizada neste projeto para caracterizar o ordenamento das membranas estudadas após interação com os fármacos em questão.

2.4.3. Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

A técnica de DSC propicia medidas de trocas de calor no interior de uma célula calorimétrica entre dois recipientes de alumínio em função da temperatura ou do tempo. Um dos recipientes contém a amostra a ser investigada e o outro, uma referência. Um experimento de DSC em função da temperatura consiste em aquecer a amostra e a referência, com uma taxa de aquecimento fixa (Figura 16). Inicialmente, a diferença de temperatura (ΔT) entre os dois recipientes é nula. No entanto caso ocorra alguma modificação na estrutura atômica da amostra, devido ao efeito da temperatura, ΔT será diferente de zero, pelas variações na distribuição do estado energético do sistema

amostra-referência^{128,129}. Esta variação é traduzida através de picos no espectro DSC, os quais podem ser de dois tipos: (i) exotérmicos, quando a amostra encontra-se em um estado mais energético e transita para um estado de menor energia, liberando calor (um exemplo é a relaxação estrutural) e, (ii) endotérmico, quando a amostra absorve calor para vencer a barreira de energia que separa os dois estados energéticos. Picos endotérmicos podem estar associados a transições de fase gel para fase fluida¹³⁰.

As curvas de DSC relacionam a taxa de fluxo de calor contra temperatura. Desta curva podemos obter a variação de entalpia (ΔH) associada aos processos exotérmicos e endotérmicos, ocorrendo na amostra investigada. O ΔH de transição é a energia, ou o calor, necessário para que a transição de fase gel para líquido-cristalino se complete¹⁵. O valor de ΔH para cada evento é obtido através da integração da área sob o pico correspondente.

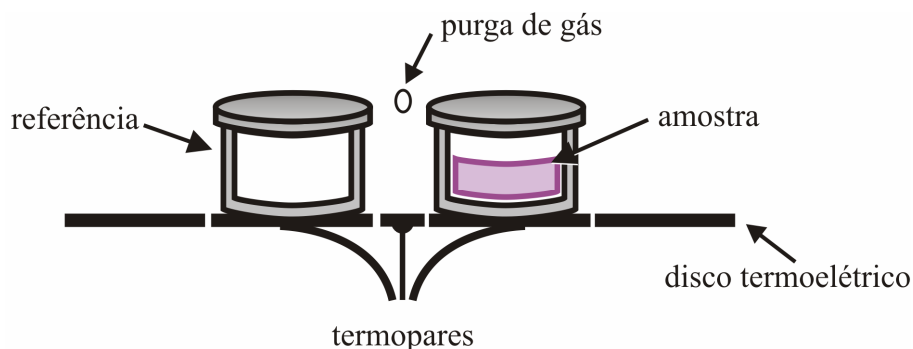


Figura 16 - Arranjo experimental de calorimetria de varredura diferencial por fluxo de calor.

Esta relação pode ser explicada pela equação básica envolvendo o calor liberado ou absorvido pela amostra durante a transição por unidade de tempo (dH/dt)

$$\frac{dH}{dt} = - \frac{dq}{dt} + \frac{(C_s - C_r) dT_p}{dt} - \frac{RC_s d^2q}{dt^2} \quad [5]$$

em que dq/dt é o fluxo de energia registrado pelo aparelho de DSC, C_s é soma das capacidades caloríficas referentes à amostra e a referência, C_r é a capacidade calorífica da referência, T_p é a temperatura do disco termoeletrico do aparelho expressa por unidade de tempo, e R é a resistência térmica. A área sobre o pico da curva é $\Delta q = -\Delta H$.

A aplicação da técnica de DSC, para o estudo da transição da fase gel para líquido-cristalina em bicamadas lipídicas, encontra-se bem documentada na literatura ^{128,131-133}. As mudanças nas interações intercadeias acil de lipossomas durante as transições de fase podem ser analisados por DSC, através da análise da variação de entalpia no sistema (ΔH). O ΔH de transição está relacionado ao ordenamento do arranjo molecular lipídico ¹⁵.

Desta forma, o cálculo dos valores de ΔH foi utilizado para investigar o efeito de melatonina e vincristina no comportamento termotrópico das membranas.

2.4.4. Medidas em cuba de Langmuir

As medidas de parâmetros relacionados aos filmes de Langmuir, tais como pressão e área de superfície, são realizadas em uma cuba ou balança de Langmuir. Esta cuba tem aspecto retangular e é composta por material hidrofóbico, como o politetrafluoroetileno (Teflon). Como descrito anteriormente, a cuba de Langmuir conta com uma barreira de compressão móvel, a qual pressiona horizontalmente as moléculas dispersas até que uma monocamada compacta seja formada, definindo desta maneira a área inicial do filme. À medida que esta barreira se movimenta, os valores de tensão, pressão e/ou área superficial podem ser obtidos ⁴³. A figura 17 demonstra uma cuba de Langmuir, a barreira móvel e os medidores de pressão.

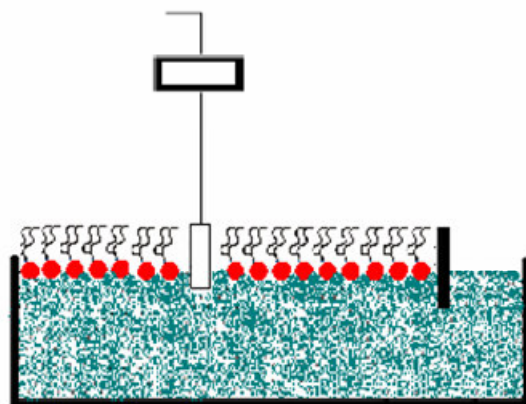


Figura 17 - Representação esquemática da balança de Langmuir, incluindo a barreira móvel e os sensores de pressão.

No estudo de interações entre fármacos e filmes de Langmuir, devem-se considerar os seguintes parâmetros: i) a pressão inicial do filme, que reflete o empacotamento dos lipídios na monocamada, ii) a concentração do composto na subfase, iii) os valores de variação máxima da pressão de superfície do filme lipídico após interação com o composto, no caso de estudos com variações de pressão superficial, e iv) a área superficial e suas variações em função da incorporação do composto.

Assim sendo, o estudo pode ser realizado de duas formas: i) mantendo-se a área superficial do filme constante e medindo-se as alterações na pressão superficial à medida que o composto é adicionado na subfase, e ii) mantendo-se a pressão superficial do filme constante e monitorando-se a interação através de medidas da variação na área superficial do filme ⁴⁴.

A pressão superficial do filme pode ser calculada a partir da diferença entre os valores de tensão superficial da subfase na ausência do filme e na presença do mesmo. Na cuba de Langmuir, a pressão pode ser determinada medindo-se as tensões

superficiais pelo método da placa de Wilhelmy ou a partir das medidas de força por unidade de comprimento, dentre outros¹³⁴. A análise de isotermas relacionando valores de pressão de superfície e área por molécula permite a observação de diferentes fases e organizações da monocamada, tais como a fase líquido-expandida e a líquido-condensada⁴³.

A inserção de fármacos num filme de Langmuir lipídico pode provocar a expansão do filme, ou o aumento do valor da área por molécula. Se a incorporação se der em regiões próximas ao grupo polar, pode ocorrer um aumento no valor da área por molécula do material anfipático, ou ainda não haver alterações em tais valores. Caso a incorporação do composto afete as interações intra-moleculares dos lipídios, a área por molécula de lipídio pode diminuir, causando a condensação do filme¹³⁵.

As medidas realizadas na cuba de Langmuir podem ser efetuadas observando-se a superfície através de microscopia no ângulo de Brewster. Esta técnica é discutida a seguir, e pode fornecer informações sobre a influência de fármacos na espessura da monocamada.

2.4.5. Microscopia no ângulo de Brewster (BAM)

A microscopia no ângulo de Brewster é uma técnica não-invasiva que pode fornecer informações estruturais, morfológicas e relativas à orientação de uma camada lipídica¹⁸. Esta técnica permite a observação direta dos filmes de Langmuir, sendo sensível à densidade da superfície e a anisotropia dos domínios de fase^{136,137}.

O princípio de funcionamento da microscopia no ângulo de Brewster fundamenta-se no fato de que um feixe de luz polarizado quando incide em um substrato isotrópico não produz reflexão quando o ângulo de incidência corresponde ao ângulo de Brewster. O ângulo de Brewster satisfaz a equação:

$$\tan \theta = n_2/n_1 \quad [6]$$

na qual, n_2 corresponde ao índice de refração da subfase e n_1 ao índice de refração do ar. No caso de interfaces fase gasosa/fase aquosa, o ângulo de Brewster é de aproximadamente 53°.

Quando uma monocamada de um material anisotrópico, que apresente um índice de refração diferente de n_2 e n_1 (vide equação 6), é adsorvida na interface, uma alteração na refletividade do sistema ocorre. Assim sendo, a superposição das reflexões resultantes fornece um sinal mensurável, que pode ser usado para formar imagens de alto contraste da morfologia lateral da monocamada depositada na interface. Por exemplo, se a superfície da água está sendo incidida com luz polarizada no ângulo de Brewster antes da deposição da monocamada anfifílica na interface ar-água, não haverá reflexão da luz. Assim sendo, a cor no fundo da imagem será negra¹³⁸. Após deposição e compressão da monocamada na cuba de Langmuir, as alterações na refletividade do sistema poderão ser visualizadas (Figura 18).

O microscópio no ângulo de Brewster possui uma fonte de luz (laser), juntamente com um ou dois filtros polarizadores, e um detector de luz. O primeiro filtro, rotatório, é responsável pela polarização do raio de luz e o segundo, o analisador, pela análise do estado de polarização da parte refletida. Os domínios anisotrópicos em uma amostra mostram inversão de contraste ao girar o filtro analisador, obtendo-se imagens que facilitam a visualização dos domínios.

As imagens de microscopia no ângulo de Brewster podem ser codificadas nos chamados níveis de cinza. Para determinar a espessura da monocamada, pode-se utilizar um procedimento de calibração, que determina a função linear entre a refletância e o nível de cinza. Esta função é estabelecida comparando-se uma curva experimental de níveis de cinza em função do ângulo de incidência e uma curva de Fresnel (curva de

refletância em função do ângulo incidente). A partir dos valores de refletância, um modelo de espessura do BAM permite a avaliação da espessura da monocamada a partir do valor experimental do ângulo de Brewster e o índice óptico do filme. Este modelo é baseado na relação diretamente proporcional entre a refletância e o quadrado da espessura do filme interfásico, quando o índice óptico do filme é constante,

$$R \propto (n d)^2$$

em que R é a refletância, n é o índice óptico do filme e d a espessura da monocamada

18,49

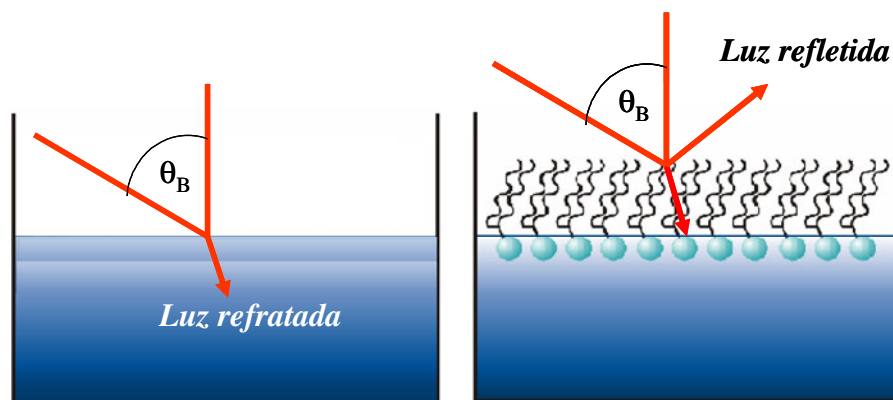


Figura 18 - Representação esquemática da mudança de refletividade da luz incidente no ângulo de Brewster na ausência e presença do filme de Langmuir.

Desta forma, a microscopia no ângulo de Brewster torna-se interessante para monitorar a influência de fármacos nos valores relativos à espessura da bicamada, complementando os estudos realizados com a cuba de Langmuir.

2.4.6. Microscopia de força atômica (AFM)

A técnica de AFM no modo contato baseia-se na detecção de forças atrativas e repulsivas que ocorrem entre os átomos presentes em uma amostra. Para realização desta técnica, a amostra deve estar imobilizada em um substrato sólido, e os átomos de

uma ponta de Si_3N_4 rastreiam a superfície da amostra. Esta ponta está associada a um suporte flexível denominado cantilever, também composto de Si_3N_4 , responsável pela transdução de um sinal para o detector (Figura 19) ⁵⁸.

Qualquer interação entre a ponta e a amostra acarretará uma deflexão no cantilever. Esta deflexão pode ser proporcional à força de interação. Para detectar a deflexão do cantilever, o aparelho conta com a emissão de um laser, focado na extremidade do cantilever (onde está suportada a ponta). O laser deve refletir em um fotodiodo. A variação no ponto de incidência do raio refletido no fotodiodo é associada à deflexão do cantilever e, conseqüentemente, à interação da ponta com a amostra. As forças detectadas geralmente são da ordem de 10^{-7} a 10^{-12} N ¹³⁹.

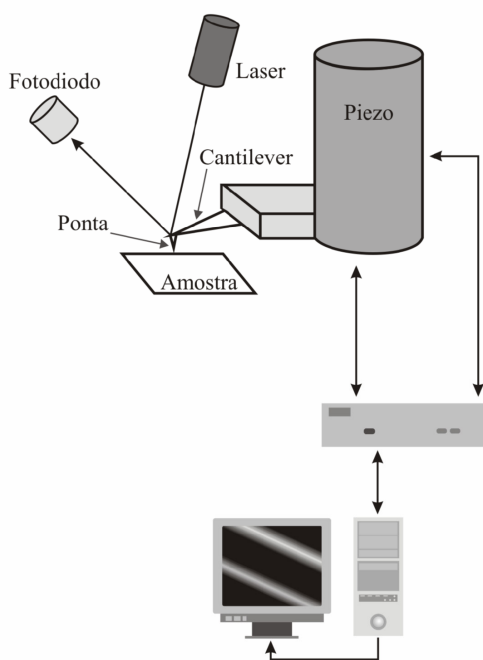


Figura 19 – Representação esquemática dos componentes de um aparelho de AFM.

A varredura da ponta na superfície da amostra é realizada através do movimento de um suporte piezoelétrico, ou piezo, que está acoplado ao cantilever. O piezo permite

o deslocamento da ponta na amostra no plano xy e no eixo z. Este mecanismo de movimentação apresenta variações de aproximadamente 0,1 nm/V de potencial elétrico aplicado ¹⁴⁰. Desta forma, quando a ponta alcança um grau de depressão na amostra, ocorrem mudanças nas forças de interação, devido à variação da distância ponta-amostra. Através de um mecanismo de retroalimentação, a varredura é realizada de forma a que a distância ponta-amostra permaneça constante, compensada pela variação do comprimento do piezo. Tal variação é convertida em voltagem, em função da relação tamanho/ voltagem apresentada anteriormente, que é registrada e processada em um software para reconstituição de uma figura pseudo-tridimensional da amostra, em que as áreas mais claras representam os domínios lipídicos de maior altura (tais como domínios em fase gel) e as regiões mais escuras, os domínios lipídicos de altura menor (como, por exemplo, os domínios em fase fluida) ⁵⁸. A relação entre a altura dos domínios e o brilho na imagem está demonstrada na figura 20.

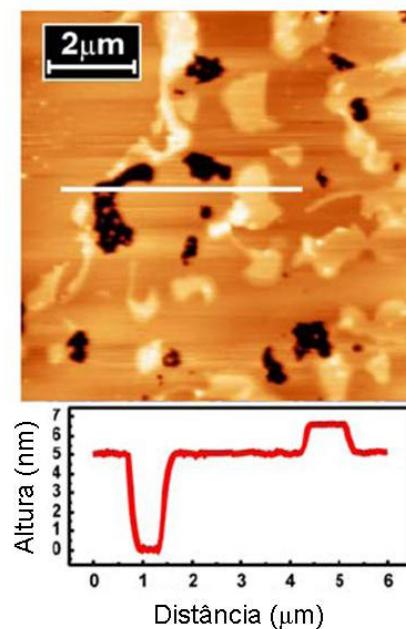


Figura 20 - Imagem de AFM de uma membrana de DMPC: DOPC suportada em mica ¹⁴¹.

A microscopia de força atômica tem se apresentado como um método útil para investigar diferentes domínios de fase na topografia de misturas lipídicas ¹⁷. A técnica, dentre outras funções, viabiliza a observação e caracterização não somente de filmes lipídicos em meio aquoso, mas também da sua interação com agentes externos, como peptídeos e outras moléculas ¹⁴²⁻¹⁴⁴. Medidas *in-situ* de AFM, com a amostra inserida em meio aquoso, permitem investigar fenômenos biológicos em tempo real e em meios fisiológicos.

Neste trabalho, as membranas foram investigadas através de AFM em modo contato, utilizando-se uma força operacional de varredura mínima. Deste modo, evitou-se que a ponta que efetua a varredura da amostra danificasse a mesma.

CAPÍTULO III - OBJETIVOS

CAPÍTULO III

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é propor estratégias para caracterizar alterações promovidas por fármacos na dinâmica e/ou topologia de modelos de membrana, através do uso de diversas técnicas instrumentais. As caracterizações das interações entre membranas e moléculas, protéicas ou não, podem contribuir para o melhor entendimento de mecanismos de ação dos fármacos, bem como para o desenvolvimento de formas farmacêuticas mais eficazes no tratamento de várias doenças. Os fármacos a serem utilizados serão melatonina e vincristina.

Objetivos específicos

✓ Caracterizar os efeitos provocados pela interação de melatonina e vincristina em lipossomas, através do uso das técnicas de:

- RMN, medindo-se i) o tempo de relaxação longitudinal obtidos para os núcleos ^{13}C e ^1H , ii) a anisotropia de deslocamento químico em espectros de RMN de ^{31}P , iii) a constante quadrupolar, parâmetro de ordem, momentos espectrais de primeira ordem e T_m , obtidos a partir do tratamento de espectros de ^2H , e iv) as interações diretas (RMN de ^1H MAS) e espaciais obtidas de espectros de RMN de ^1H (RMN de ^1H MAS- NOESY), de membranas compostas por EPC, EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC ou $^2\text{H}_{27}$ -DMPC;
- Espectroscopia de fluorescência, comparando-se bandas de emissão de fluorescência da sonda merocianina-540 (MC-540) incorporada em vesículas de EPC na ausência e na presença dos fármacos;

- DSC, a partir da análise de valores de variação de entalpia (ΔH) de lipídios de EPC puros e na presença dos fármacos;
- ✓ Investigar os efeitos provocados por melatonina nos valores de área molecular e espessura de monocamadas de Langmuir constituídas de POPC, através de experimentos com a cuba de Langmuir e microscopia no ângulo de Brewster;
- ✓ Caracterizar a influência de melatonina nos rearranjos lipídicos termo-dependentes de bicamadas lipídicas compostas por DMPC suportadas em mica, através da técnica de AFM;
- ✓ Analisar as interações fármaco-membranas e relacionar com as propriedades biológicas e terapêuticas de melatonina e vincristina.

CAPÍTULO IV – MATERIAIS E MÉTODOS

CAPÍTULO IV

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e materiais utilizados no trabalho

L- α -fosfatidilcolina de ovo fresco, dimiristoilfosfatidilcolina (1,2 dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina), palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), dimiristoilfosfatidilcolina seletivamente deuterada (1,2 dimiristoil-D₂₇-sn-glicero-3-fosfocolina), palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina seletivamente deuterada (1-palmitoil-D₃₁-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) (AVANTI POLAR LIPIDS, EUA), tampão fosfato de potássio, tris (tris-hidroximetil-aminometano), ácido 2,2,3,3-*d*₄-3-trimetilsililpropionico (TSP) (MERCK, Alemanha), melatonina (ALDRICH, EUA), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfonico), merocianina-540, água isenta de D₂O (SIGMA-ALDRICH, EUA), desoxicolato de sódio (BOEHRINGER MANNHEIM, Alemanha), colato de sódio (SERVA, Alemanha), água deuterada 99,9% (CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES INC.), cloreto de magnésio, sulfato de vincristina (FLUKA, Alemanha) e mica muscovita (SPI, Supplies, EUA). Todos os reagentes utilizados neste trabalho possuem grau de pureza analítica.

4.2. Experimentos com lipossomas

4.2.1. Preparação dos lipossomas através do método de diálise

Neste trabalho, o método de diálise foi utilizado para preparar lipossomas do tipo LUV, de tamanho médio de 400 nm, testados na presença e ausência de melatonina através de ensaios de espectroscopia de fluorescência e DSC. Os lipídios foram previamente solubilizados em tampão de solubilização contendo tricina (10,0 mM) e os surfactantes colato de sódio (45,0 mM) e desoxicolato de sódio (25,0 mM), pH 8,0^{36,37}. O tampão continha ou não a melatonina (0,25 mM). Em um recipiente específico, esta

solução foi submetida à diálise. A membrana utilizada para este processo era constituída por policarbonato cujo tamanho de poro estimado é de 1-2 nm. A diálise foi realizada contra um volume de dois litros de tampão, constituído de 10,0 mM de tricina e 2,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2), pH 8,0. A remoção dos surfactantes foi seguida de coalescência das micelas formadas e rearranjo lipídico para uma configuração em bicamada³³. A diálise foi efetuada durante 5 horas a 30,0 °C (Figura 21).

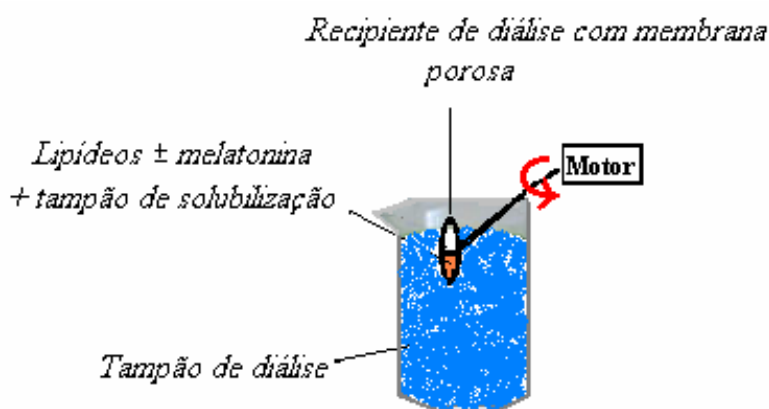


Figura 21 - Esquema de diálise para preparação de lipossomas unilamelares.

4.2.2. Preparação dos lipossomas através do método de hidratação de vesículas

Este método foi usado na preparação de lipossomas do tipo vesículas multilamelares grandes (MLV), na ausência e na presença de melatonina ou vincristina, testados nos ensaios de RMN e AFM. As etapas do método de hidratação de vesículas consistiram em: i) co-solubilizar o (s) lipídio (s) em clorofórmio, ii) evaporar o solvente através das técnicas de rotaevaporação, “speed vac” (AES 1016, Savant Instruments) ou ainda através de um fluxo de nitrogênio, iii) eliminar os traços de solvente através de liofilização ou por dessecação a vácuo, iv) hidratar o filme lipídico em tampão de diálise pH 7,4, através de agitação em vortex, para formação das vesículas, e v)

submeter a 3 ciclos de congelamento-aquecimento (freeze-thaw), de forma a manter o tamanho das vesículas uniforme³³ (Figura 22).

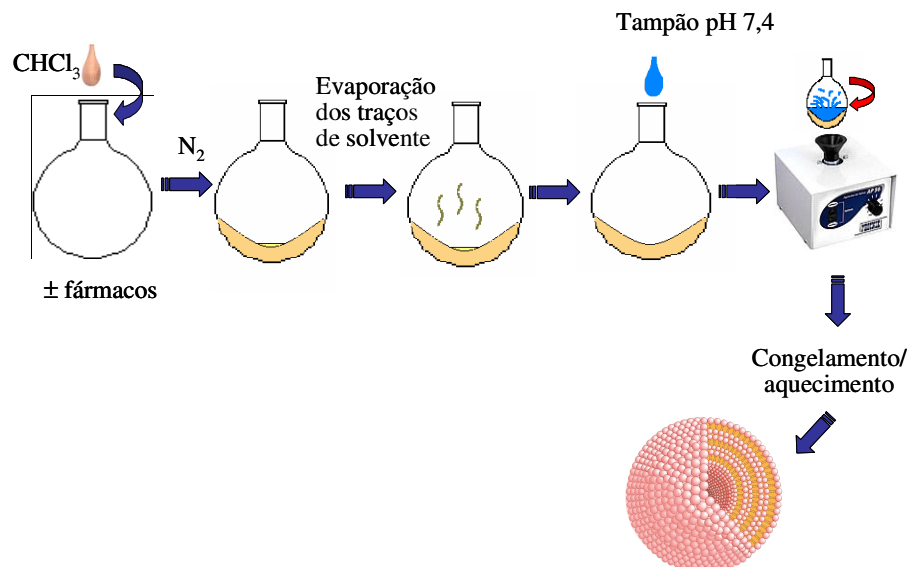


Figura 22 – Esquema da preparação de vesículas multilamelares pelo método de hidratação de vesículas.

4.2.3. Incorporação de melatonina aos lipossomas (MLV)

A melatonina foi incorporada nas MLV na etapa de co-solubilização dos lipídios em solvente orgânico. As concentrações de melatonina foram de 0,25 e 48,00 mM para análises de espectroscopia de fluorescência/DSC e RMN, respectivamente. As razões molares melatonina: lipídio variou em função da técnica utilizada, 1:250 para os ensaios de detecção do percentual de incorporação, fluorescência e DSC e 1:3 para os ensaios de RMN.

4.2.4. Incorporação de vincristina aos lipossomas (MLV), através de “gradiente” de pH

A vincristina foi incorporada nos lipossomas a partir da formação de um gradiente de pH através das membranas das vesículas, a 25 ° C (ver sessão 2.3.2.). Para

isto, as MLV foram previamente preparadas em tampão citrato de sódio (0,3 M) pH 4,0. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 14000 g. O sobrenadante foi descartado. Os lipossomas decantados foram ressuspensos em tampão fosfato de sódio (0,5 M) pH 7,6 contendo a vincristina. Posteriormente a amostra foi incubada a 60°C por 3 horas^{80,86}. A razão molar vincristina: lipídio foi de 1:166.

4.2.5. Determinação do percentual de incorporação dos fármacos nas vesículas

A liberação de melatonina e vincristina dos lipossomas foi monitorada a 25 °C por espectroscopia UV, em aparelho Pharmacia LKB- Ultrospec III nos comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{\max}) de 285 e 296 nm, respectivamente. De forma a provocar a liberação da melatonina incorporada nas vesículas, as membranas foram solubilizadas com o surfactante Triton X-100, a 0,6 % (v/v)^{145,146}, após 3 lavagens prévias com tampão. No caso da vincristina, o fármaco livre em solução foi retirado através de passagens por colunas Sephadex. Em seguida, a suspensão de lipossomas foi adicionada ao meio Triton X-100 a 8% (v/v). As amostras foram agitadas e em seguida, centrifugadas. Foi realizada a leitura espectrofotométrica dos valores de absorbância do material sobrenadante, contendo ou não os fármacos livres em solução. A absorbância foi monitorada em intervalos de 15 minutos, no caso da melatonina, e após um tempo de incubação de 3 horas da amostra com vincristina. A concentração das substâncias foi determinada considerando-se os valores de absortividade molar de melatonina e vincristina iguais a 27550 e 15136 M⁻¹ cm⁻¹, respectivamente^{147,148}. Os controles foram realizados paralelamente, que consiste em: (i) curva na ausência de Triton X-100 e (ii) curva do fármaco livre.

4.2.6. Medidas de RMN

4.2.6.1. RMN no estado líquido

✓ Identificação das amostras

Os ensaios de identificação das amostras foram realizados no Institut Européen de Chimie et Biologie, na Université Bordeaux I (Bordeaux, França), sob supervisão do Prof. Dr. Erick Joel Dufourc. A melatonina (8mM) ou a vincristina (2mM) foram solubilizadas em uma mistura de H₂O:D₂O na razão de 80:20 (v/v). Os espectros foram obtidos em aparelho Bruker Avance DPX 400 MHz, operando a 400,00 e 100,62 MHz para a ressonância de ¹H e de ¹³C, respectivamente. Os ensaios foram realizados a 25°C. Os espectros foram obtidos nas seguintes condições experimentais: duração do pulso $\pi/2$ de 13 μ s; janela espectral de 11 e 210 ppm para a RMN de ¹H e ¹³C, respectivamente; intervalo de relaxação de 2 s; número de transientes 16 e 1024 para a RMN de ¹H e ¹³C, respectivamente. Antes da transformada de Fourier, foi realizada a multiplicação exponencial com um fator de alargamento de linha de 0,3 Hz para a RMN de ¹H e 2 Hz para os espectros de RMN de APT de fase invertida spin-echo de ¹³C. Os ensaios de correlação homonuclear (espectroscopia de correlação, ¹H, ¹H- COSY) foram adquiridos nas seguintes condições: duração do pulso $\pi/2$ de 13 μ s; número de pontos de dados adquiridos de 1K para F1 e 128 para F2; janela espectral de 11 ppm em F1 e F2. Os experimentos de correlação heteronuclear (coerência heteronuclear múltiplo quântica, ¹H, ¹³C, HMQC) foram obtidos através dos seguintes parâmetros: intervalo de relaxação 2s, 3,5 μ s como valor calculado para D2, número de pontos de dados adquiridos de 1K para F1 e 128 para F2.

✓ Medidas de tempos de relaxação longitudinal (T₁)

As medidas de tempo de relaxação longitudinal (T₁) de ¹³C e ¹H das LUVs, ao interagir com a melatonina, foram obtidas em diferentes campos magnéticos. A

concentração de lipídios utilizada foi de 170,00 mM, e a de melatonina 0,68 mM. Os valores de tempo de relaxação (T_1) de ^{13}C (100 MHz) foram obtidos em aparelho Varian Mercury 400, na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os ensaios foram realizados a 25°C, através de seqüência de pulso com recuperação da inversão, utilizando-se uma faixa de intervalos entre pulsos de radiofrequência de 0,1 a 128 s. O benzeno foi utilizado como referência externa para estes ensaios, presente em um tubo co-axial inserido no tubo de RMN. Os valores de T_1 de ^1H foram obtidos em campo magnético de 33 MHz, em espectrômetro NMR MARAN Ultra 23 (Resonance, Oxford – UK), na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os valores foram determinados a 27 °C, através da seqüência de pulsos de recuperação ($180^\circ - \tau 90^\circ$), utilizando-se uma faixa de intervalos entre pulsos de 5×10^{-4} a 30 s. Outros valores de T_1 foram calculados a partir do fit de exponenciais, sendo determinados a partir de um gráfico de amplitude de relaxação versus tempo de relaxação processado através do software WINDXP.

4.2.6.2. RMN no estado sólido

Os estudos efetuados com RMN no estado sólido foram realizados no Institut Européen de Chimie et Biologie, na Université Bordeaux I (Bordeaux, França).

✓ Estudos de dinâmica molecular

Os espectros de RMN foram obtidos através de um aparelho Bruker Avance DSX 500 MHz, operando a 500,0; 76,8 e 202,3 MHz para ressonância de ^1H , ^2H e ^{31}P , respectivamente. As amostras usadas nas medidas de RMN de ^2H e de ^{31}P foram mantidas em rotor cilíndrico, em volumes de 90 μL . A concentração dos lipídios foi mantida em 144,0 mM. A concentração de melatonina foi mantida em 48,0 mM e a de

vincristina em 0,87 mM. O tampão usado na preparação das amostras a serem usadas em RMN de ^2H continha água desprovida de D_2O como solvente. Durante os ensaios de RMN de ^2H foram utilizados os seguintes parâmetros de aquisição: seqüência de pulsos echo quadrupolar com ciclagem de fase ¹⁴⁹, com duração de pulso $\pi/2$ de 3,5 μs ; intervalos entre pulsos de 40 μs e tempo de espera da reciclagem de 1,5 s; número de transientes de 1024 e janela espectral de 500 kHz. Após a transformada de Fourier, foi efetuado o alargamento exponencial de linha de 100 a 300 Hz. A temperatura foi regulada para $\pm 1^\circ\text{C}$, com tempo de equilíbrio de 30 min antes da aquisição das bandas de RMN. Os experimentos com variação térmica foram realizados em faixa de temperatura de 10 a 37°C (temperaturas não aferidas). Os momentos espectrais foram calculados em um programa Origin C inserido no programa Microcal origin, a partir de dados exportados do software da Bruker. As medidas de RMN de ^{31}P foram efetuadas utilizando-se a seqüência de pulso echo de Hahn com desacoplamento de proton ¹⁵⁰. Os parâmetros utilizados foram: duração de pulso $\pi/2$ de 5,6 μs ; intervalos entre pulsos de 30 μs ; tempo de espera de reciclagem de 5s. O número de transientes utilizado foi de 2048, e os mesmos foram registrados em uma janela espectral de 100 kHz. O valor utilizado para o procedimento de alargamento exponencial de linha antes da transformada de Fourier foi de 100 Hz.

✓ Estudos de topologia da membrana

Durante os experimentos de RMN HRMAS, o volume de 50 μL de amostra foi depositado em rotor cilíndrico apropriado. A mistura de H_2O : D_2O (80:20, v/v) foi utilizada como solvente do tampão usado nestes experimentos. A velocidade de rotação do cilindro foi de 8 kHz e a temperatura dentro do rotor ajustada para 25°C . O trimetilsilil propionato (TSP) foi utilizado como referência interna. Foram usados os

seguintes parâmetros de aquisição: duração de pulso de 5,20 μ s; número de pontos de dados adquiridos de 32 K; janela espectral de 5 kHz; e tempo de espera da reciclagem de 2s. O número de transientes foi de 16. Os experimentos de NOESY sensíveis à fase foram efetuados utilizando-se o modo States-TPPI. O tempo de mistura de 45 ms foi usado na seqüência de NOESY, para evitar a difusão de spin¹⁵¹. Foram coletados 2048 pontos em t2 e 256 pontos em t1, com 64 varreduras por incremento. A supressão do solvente foi efetuada através do programa Watergate. O tratamento e análise dos dados adquiridos foram realizados através do programa Topspin^{152,153}.

4.2.7. Experimentos de espectroscopia de fluorescência

Os experimentos de espectroscopia de fluorescência foram efetuados em espectrofotômetros Hitachi F-2000, na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os espectros de fluorescência foram obtidos de amostras de lipossomas compostos por EPC (5 μ M de lipídios na ausência ou presença de $2,0 \times 10^{-2}$ μ M de melatonina ou $3,2 \times 10^{-2}$ μ M vincristina) previamente incubados com a MC-540 ($8,0 \times 10^{-3}$ μ M) durante 30 minutos. Os “experimentos-controle” foram efetuados em paralelo, na ausência da sonda, para eliminar a interferência por eventual emissão de fluorescência provinda dos lipídios insaturados. As amostras foram excitadas a 540 nm e o espectro de emissão da sonda foi obtido na faixa de comprimento de onda de 400 a 800 nm, com velocidade de varredura de 240 nm por minuto¹⁵⁴.

4.2.8. Medidas de DSC

As amostras (lipídios a 66,0 mM contendo melatonina a 0,25 mM ou vincristina a 0,40 mM) foram analisadas em aparelho Shimadzu DSC-60, na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As amostras foram depositadas em recipientes de alumínio,

as “panelinhas”, em aproximadamente 2,0 mg. Após selagem dos recipientes, estes foram submetidos a varreduras efetuadas a uma velocidade de 5°C/min em faixa de temperatura -50°C a 30°C, com fluxo de nitrogênio de 50/50 mL/min. A referência para este ensaio foi um recipiente de alumínio apropriado para DSC vazio. A calibração do aparelho, no que diz respeito à temperatura e calorimetria, foi realizada com índio.

4.3. Experimentos com filmes de Langmuir

4.3.1. Formação do filme lipídico e determinação da variação de área molecular

Os experimentos com as monocamadas lipídicas foram efetuados em uma cuba de Langmuir associada a um software (Nima Technology). A cuba retangular, com área de 95,6 cm² e volume de 20,5 cm³, bem como a barreira móvel, era composta por Teflon. A pressão de superfície foi medida através de balança de Wilhelmy, utilizando-se uma peça de papel retangular, de dimensões definidas. A cuba foi preenchida com o tampão de diálise e os experimentos foram efetuados a $25 \pm 2^\circ \text{C}$. Uma monocamada de POPC ($6,2 \times 10^{-4} \text{ mM}$) pura foi formada depositando-se uma solução do lipídio em clorofórmio na interface ar-água da cuba e comprimindo as moléculas com a barreira móvel até alcançar a pressão de superfície de 25 mN/m. Esta pressão é similar à pressão de superfície observada em membranas biológicas¹⁵⁵. Todas as medidas foram obtidas mantendo-se a pressão de superfície constante, e as alterações na área molecular da monocamada foram registradas durante a injeção de uma solução aquosa de melatonina (solução estoque a 4 mM) na subfase.

4.3.2. Experimentos com microscopia no ângulo de Brewster

A morfologia das monocamadas de POPC na ausência ou presença de melatonina foi observada através de um microscópio no ângulo de Brewster (NFT

BAM2 plus), acoplado com a cuba de Langmuir. O microscópio era equipado com um laser de feixe duplo de Nd:Yag (532 nm, 50 mW), polarizador, analisador e uma câmera do tipo CCD (do inglês, “charged coupled device”). A resolução espacial do BAM era de cerca de 2 μm . A espessura da bicamada foi calculada segundo o procedimento descrito na revisão bibliográfica (sessão 2.4.5.). Considerou-se um índice óptico de 1,45.

4.4. Experimentos com bicamadas lipídicas suportadas em substrato sólido

4.4.1. Preparação das bicamadas suportadas em mica

A bicamada lipídica de DMPC (0,44 mM) foi obtida pelo método de fusão de vesículas, descrito e ilustrado na sessão 2.2.3. da revisão bibliográfica. As vesículas foram depositadas em superfície de mica recentemente clivada, e em seguida a amostra foi incubada a 16°C durante 30 minutos a temperatura ambiente, imersas em tampão HEPES- 0,9 % NaCl, pH 7,4, para formação das bicamadas suportadas ¹⁵⁶.

4.4.2. Obtenção das imagens de AFM

As imagens de AFM foram obtidas em microscópio Molecular Imaging PicoSPM, na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As medidas foram obtidas a partir de operação *in situ*, no modo contato, com ponta e cantilever compostos por Si_3N_4 (constante de mola de 0,12 N/m, Veeco Probes), em uma faixa de temperatura de 16 a 30 °C. Durante as medidas, a ponta e o cantilever permaneceram completamente imersos em tampão HEPES- 0,9 % NaCl, pH 7,4. As imagens foram analisadas através do programa WS x M 2.1 (Nanotec Eletrônica).

CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO V

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudos de lipossomas incorporados com melatonina

5.1.1. Determinação do percentual de incorporação

A quantificação de melatonina presente nos LUVs de EPC em função do tempo está demonstrada na figura 23.

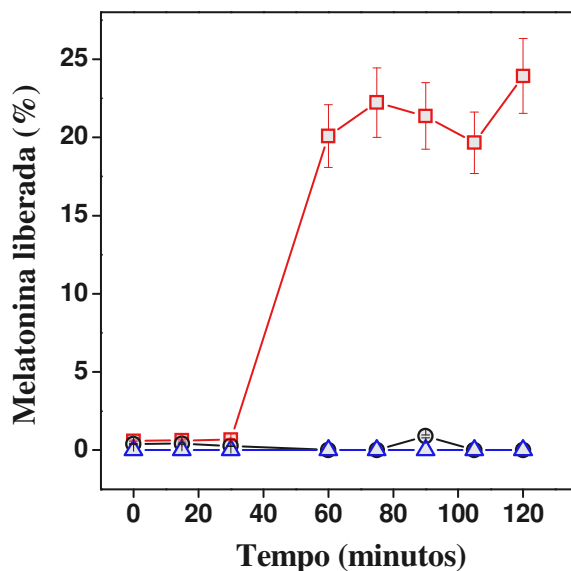


Figura 23 - Quantificação da melatonina incorporada nos lipossomas de EPC em função do tempo (curva vermelha). As curvas azul e preta demonstram a quantificação do composto na ausência do surfactante e após a adição de melatonina ao meio contendo lipossomas sem fármaco.

Os resultados indicaram um percentual de incorporação de 20 a 25 % de melatonina nos lipossomas, o que corresponde a uma concentração de 0,05 a 0,06 mM de melatonina incorporada. Como mencionado na metodologia, foi realizada uma curva controle, sem o Triton X-100, de forma a monitorar a influência de moléculas de lipídios livres ou micelas em solução. Uma terceira curva também foi obtida adicionando-se melatonina no meio contendo lipossomas sem fármaco, de forma a

controlar a difusão do fármaco para o interior das membranas. As curvas referentes aos controles demonstraram uma interferência mínima de moléculas lipídicas na detecção do fármaco livre em solução, bem como pouca ou nenhuma difusão de melatonina para o interior dos lipossomas, nas condições experimentais.

O percentual de incorporação de 25 % de melatonina nos lipossomas foi considerado satisfatório, uma vez que foi suficiente para aumentar em 40% a capacidade antioxidante do fármaco em ensaios de peroxidação lipídica em membranas (resultados não mostrados)¹⁵⁷.

5.1.2. Medidas de RMN

5.1.2.1. Identificação da melatonina

As atribuições dos deslocamentos químicos e das correlações entre núcleos da melatonina foram obtidas a partir dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (Figuras 24 e 25). As atribuições estão listadas na tabela 1, bem como as variações de deslocamento químico dos ^1H da melatonina em função da transferência do meio aquoso para o meio hidrofóbico.

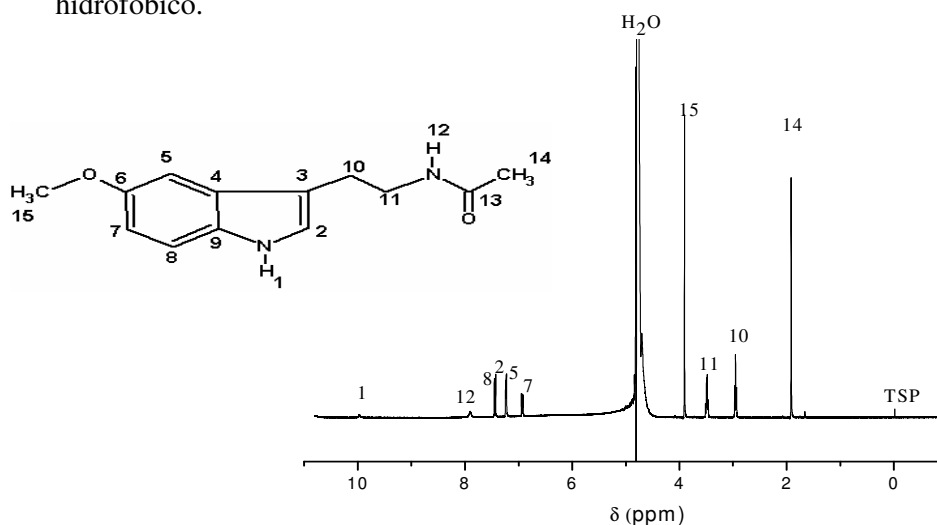


Figura 24 – Espectro de RMN de ^1H de melatonina (8mM) em $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (80:20, v/v). O espectro foi obtido a 400 MHz usando-se o TSP como padrão interno. Condições: duração de pulso 13 μs , intervalo de relaxação 2 s, fator de alargamento de linha 0,3 Hz, 25 °C.

Tabela 1 - Valores de deslocamentos químico δ (ppm) de ^{13}C e ^1H presentes na melatonina e correlações homo e heteronucleares.

^{13}C da melatonina	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	^1H da melatonina	$\delta^1\text{H}$ (ppm)			Correlações COSY
			Em meio aquoso	Em lipossomas	$\Delta\delta^a$ (ppm)	
-	-	H (1)	10,45	10,35	-0,10	-
C(2)	132,40	H (2)	7,35	7,27	-0,08	-
C(3)	119,84	-	-	-	-	-
C(4)	134,90	-	-	-	-	-
C(5)	108,72	H (5)	7,18	7,04	-0,14	-
C(6)	160,60	-	-	-	-	-
C(7)	119,54	H (7)	6,87	6,76	-0,11	8
C(8)	120,56	H (8)	7,40	7,36	-0,04	7
C(9)	139,36	-	-	-	-	-
C(10)	31,63	H (10)	2,90	2,90	- 0,00	11
C(11)	47,93	H (11)	3,49	3,42	-0,07	10, 12
-		H(12)	7,90	7,82	-0,08	11
C(13)	181,82	-	-	-	-	-
C(14)	29,60	H (14)	1,92	1,85	- 0,07	-
C(15)	63,75	H (15)	3,90	3,81	-0,09	-

^a $\Delta\delta$ é a variação de deslocamento químico das ressonâncias dos hidrogênios da melatonina causada pela transferência da molécula de um meio aquoso para um meio hidrofóbico.

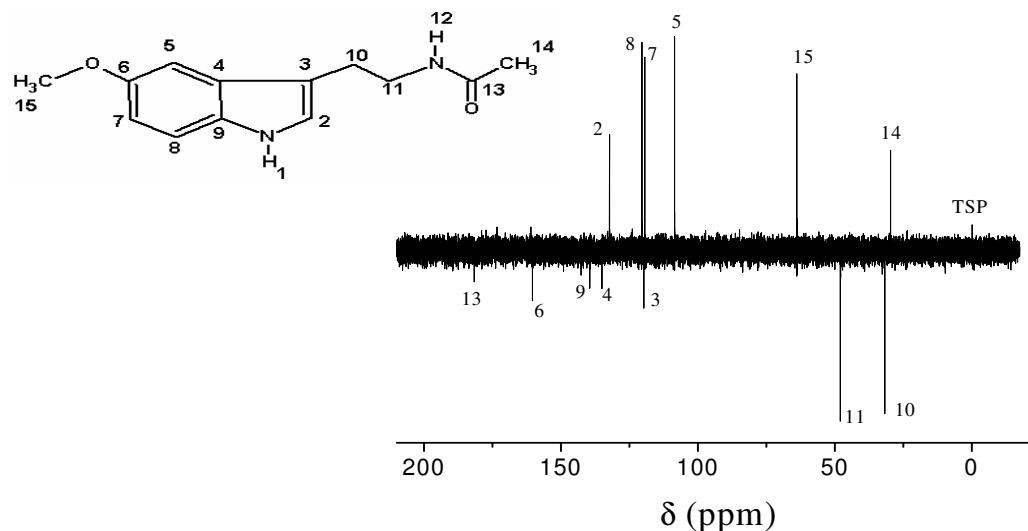


Figura 25 – Espectro de RMN APT de fase invertida spin-echo de ^{13}C de melatonina (8mM, $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 80:20, v/v; 400 MHz, padrão interno: TSP). Condições: duração de pulso 13 μs , intervalo de relaxação 2 s, fator de alargamento de linha 2 Hz, 25 $^\circ\text{C}$.

Os estudos de identificação da melatonina permitiram o reconhecimento dos picos de ressonância da melatonina nos estudos com RMN MAS de ^1H .

5.1.2.2. Estudos de dinâmica molecular I: efeitos de melatonina na cadeia acil do lipídio observados através de medidas de T_1

As medidas de T_1 forneceram informações sobre o efeito da melatonina nas cadeias laterais de LUV de EPC. A figura 26 demonstra as curvas de sinal x tempo, para a obtenção do T_1 de ^1H para lipossomas de EPC na ausência e na presença de melatonina.

A influência de melatonina nos valores de T_1 de ^1H de lipossomas de EPC está demonstrada na tabela 2. A incorporação de melatonina nas membranas provocou uma redução em 18% nos valores de T_1 de ^1H dos lipídios. Estes resultados sugeriram um

aumento na mobilidade molecular das cadeias acil do fosfolipídio, considerando o sistema utilizado como um sistema de mobilidade lenta (ver sessão 2.4.1.1.1.). O aumento da mobilidade de LUVs de EPC também poderia indicar um possível efeito de redução do tamanho vesicular, causado por melatonina. A análise dos dados também permitiu observar uma alteração importante nos valores da constante derivada dos ajustes feitos com as exponenciais de T_1 de ^1H de EPC após interação com melatonina, de $0,71 \times 10^{-3}$ a 0,08 segundos. Esta constante pode ser associada à interação entre moléculas de lipídios, uma vez que refletem o tempo utilizado para reduzir a mobilidade de ^1H da água durante sua interação com as cadeias de membrana ¹⁵⁸. Os resultados obtidos sugerem que a melatonina pode induzir uma menor interação interlipídica em membranas de EPC, distribuindo-se entre as moléculas de lipídios.

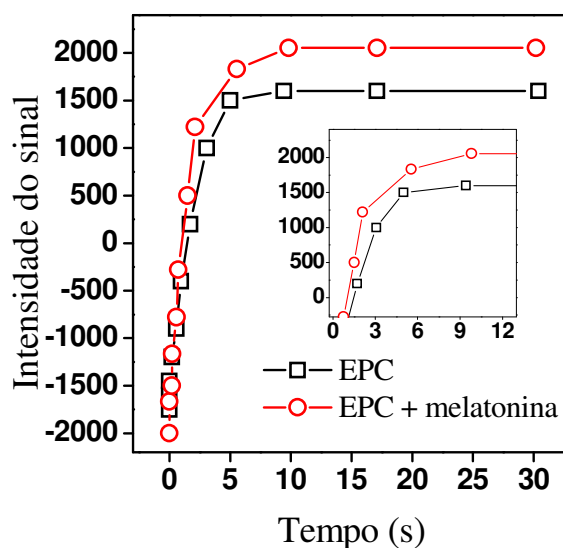


Figura 26 – Influência de melatonina no T_1 de ^1H de lipossomas compostos por EPC em tampão de diálise. Razão fármaco: lipídio 1: 250. Os valores de intensidade de sinal x tempo foram obtidos a 33 MHz, a 27 °C. Condições: seqüência de pulsos de recuperação ($180^\circ - \tau 90^\circ$), faixa de intervalos entre pulsos 5×10^{-4} a 30 s.

O aumento na mobilidade molecular das cadeias acil de EPC, provocado pela interação com melatonina, também pôde ser observado através de medidas de T_1 de ^{13}C . As análises da figura 27 e da tabela 3 indicaram que a interação com a melatonina provocou uma redução em 20 e em 40% nos valores de T_1 dos ^{13}C metilênicos adjacentes ao grupo metila terminal ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$) e aos adjacentes a insaturações ($\text{CH}_2\text{-C=C}$).

A análise dos valores representados na tabela 3 indicou que a interação EPC-membrana reduziu de forma considerável o valor de T_1 relativo ao carbono metilênico adjacente a insaturação quando comparado ao percentual de redução de T_1 para os carbonos metilênicos adjacentes ao carbono metila terminal. Considerando-se que os valores de T_1 aumentam gradualmente ao longo da cadeia acil em direção ao grupo metila terminal¹⁵⁹, a melatonina pareceu influenciar mais na mobilidade dos carbonos localizados próximos ao grupo glicerol, do que na dos localizados na região terminal da cadeia lipídica.

Tabela 2 - Influência de melatonina no T_1 de ^1H presentes em lipossomas de EPC.

	EPC	EPC + melatonina
T_1 (s), ajuste em uma curva	$2,21 \pm 0,03$	$1,80 \pm 0,04$
T_1 (s), ajuste das exponenciais^a	$0,71 \times 10^{-3} \pm 0,7 \times 10^{-5}$	$0,08 \pm 0,8 \times 10^{-3}$
	$2,23 \pm 0,02$	$1,90 \pm 0,02$

^a Ajuste das exponenciais com fator de correlação, R^2 , igual a 0.999832 e 0.999853 para EPC e EPC+melatonina, respectivamente.

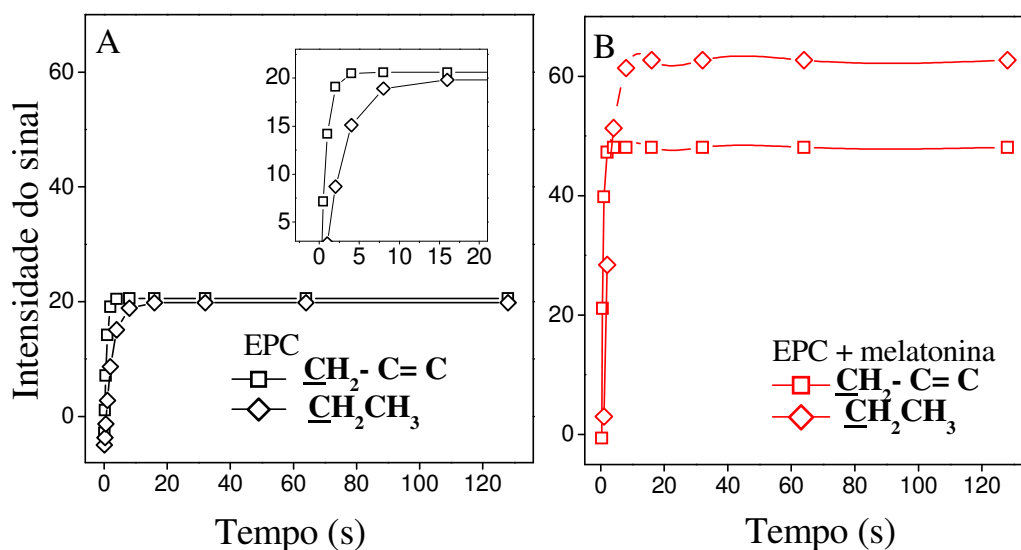


Figura 27- Determinação do T_1 de ^{13}C em lipossomas compostos por EPC na ausência (gráfico A) e presença (gráfico B) de melatonina. Razão fármaco: lipídio 1: 250. A influência de melatonina foi analisada nos ^{13}C metilênicos adjacentes ao grupo metila terminal ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$) e os adjacentes a insaturações ($\text{CH}_2\text{-C}=\text{C}$). Os gráficos foram obtidos por RMN no estado líquido, a 100 MHz, usando-se benzeno como referência externa, presente em um tubo co-axial, a 27 °C. Condições: seqüência de pulsos com recuperação da inversão, faixa de intervalos entre pulsos 0,1 a 128 s.

Tabela 3 - Efeito de melatonina no T_1 de ^{13}C presentes em lipossomas de EPC. Os valores estão expressos em segundos (s).

Posição do Carbono	T_1 de EPC	T_1 de EPC + melatonina	ΔT_1 (%) ^a
$\text{CH}_2\text{-C}=\text{C}$	$0,67 \pm 0,11$	$0,42 \pm 0,06$	40
$\text{CH}_2\text{-CH}_3$	$2,34 \pm 0,37$	$1,81 \pm 0,17$	20

^a ΔT_1 representa a percentual de variação induzida por melatonina no T_1 de ^{13}C presentes em lipossomas de EPC.

Os resultados obtidos com as medidas de T_1 de ^1H e ^{13}C indicaram um efeito de desordem provocado por melatonina na cadeia acil de lipossomas contendo EPC, bem como uma atuação do composto mais forte em regiões próximas ao grupo glicerol. Estes efeitos foram estudados de forma mais detalhada através de medidas de RMN no estado sólido, descritas a seguir.

5.1.2.3. Estudos de dinâmica molecular II: medidas de parâmetros obtidos a partir de RMN de ^2H e ^{31}P

5.1.2.3.1. Espectroscopia de RMN de ^2H

Na figura 28 estão demonstrados os espectros de RMN de ^2H de MLV contendo $^2\text{H}_{27}$ -DMPC na ausência e presença de melatonina, em três temperaturas representativas.

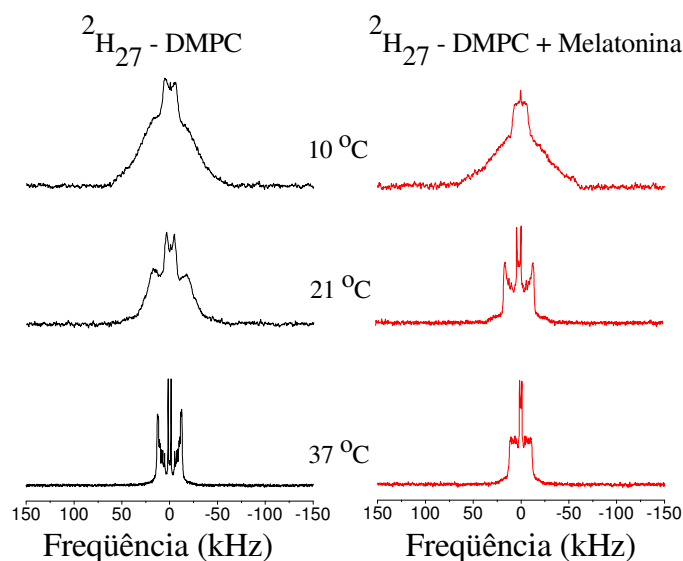


Figura 28 - Espectros de ^2H RMN de $^2\text{H}_{27}$ - DMPC na ausência (espectros pretos) ou presença de melatonina (espectros vermelhos), em diferentes temperaturas.. Razão fármaco: lipídio 1: 3. As amostras foram preparadas em tampão de diálise contendo água desprovida de D_2O . Os espectros foram obtidos por RMN em estado sólido, a 76,8 MHz.

Os valores de temperatura mostrados determinam diferentes estados de fase de uma membrana de DMPC. A T_m de $^2H_{27}$ - DMPC é cerca de 21°C, como dito anteriormente ²³. Os espectros obtidos a 10 °C, bem como o espectro de lipídio puro a 21 °C possuem pouca simetria, o que é típico de lipídios em fase gel. Os espectros restantes ($^2H_{27}$ - DMPC na presença de melatonina a 21 °C e os espectros obtidos a 37 °C) mostram ressonâncias típicas de lipídios em fase fluida, influenciadas por fatores como a dinâmica rotacional molecular de $^2H_{27}$ - DMPC ao longo de seu próprio eixo ⁹⁴. A presença de melatonina no sistema demonstrou um efeito importante na temperatura de 21°C. Tal modificação indica que, a 21°C, a melatonina pode induzir a transição de fase de $^2H_{27}$ - DMPC de gel para fluida.

O efeito da melatonina na transição de fase do lipídio foi quantificado através do gráfico de variação térmica dos valores de M_1 , demonstrado na figura 29. A redução nos valores de M_1 também é refletida pela redução dos valores de S_{CD} , na escala a direita do gráfico. Os valores estão multiplicados por 2, e compreendidos na faixa de valores entre 0 (zero), que corresponde ao grau mais elevado de desordem, e 1, referente a ordem completa, a molécula rígida. A curva de S_{CD} demonstra que a melatonina induz a uma desordem no sistema lipídico, em altas temperaturas.

O gráfico indica que a melatonina induz a uma redução na T_m de $^2H_{27}$ - DMPC de aproximadamente 3,5 °C. Este resultado está de acordo com respostas obtidas através de experimentos com DSC em MLV de DMPC, após interação com uma concentração de melatonina similar à utilizada neste trabalho ⁷⁸. Os resultados de DSC demonstraram uma redução de aproximadamente 3,2 °C na T_m de DMPC induzida pela presença de melatonina no sistema.

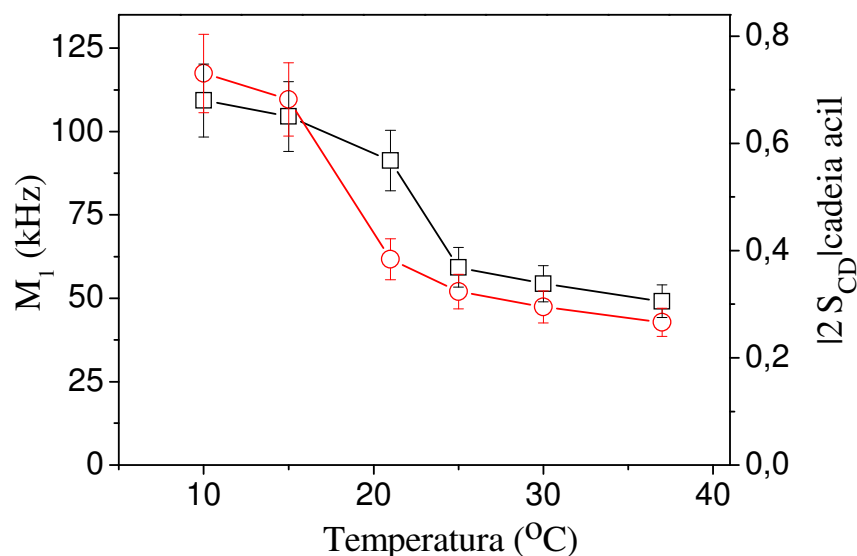


Figura 29 - Variação térmica dos valores de momentos espectrais de primeira ordem (M_1) e parâmetros de ordem globais (S_{CD}) de vesículas contendo $^2H_{27}$ -DMPC na ausência (curva preta) e presença (curva vermelha) de melatonina. Razão fármaco: lipídio 1: 3. As amostras foram preparadas em tampão de diálise contendo água desprovida de D_2O . Os valores de M_1 foram obtidos através de medidas de RMN em estado sólido, a 76,8 MHz.

De forma a obter mais informações sobre tal efeito de desordem induzido nas cadeias acil de fosfatidilcolina, foi investigada a influência da melatonina nos valores de S_{CD} referentes a cada posição de carbono deuterado de lipossomas de EPC: $^2H_{31}$ -POPC, a 25 °C. O detalhe mostrado na figura 30 representa os espectros de 2H RMN do lipídio na ausência e presença de melatonina, após deconvolução espectral. A partir da superposição dos espectros, foi possível determinar uma redução de aproximadamente 1,5 kHz nos valores de $\Delta\nu_Q$ referentes aos primeiros carbonos da cadeia acil.

A partir dos espectros mostrados no detalhe da figura 30, foram calculados os valores de S_{CD} correspondentes a cada posição dos carbonos deuterados da cadeia acil lipídica. Nestas curvas, podem ser observadas as variações graduais dos valores de S_{CD} próximo à interface da membrana, definindo uma região estável, chamada “plateau”.

Esta região é seguida por um decréscimo rápido dos valores de S_{CD} na região central da bicamada. Tal decréscimo é esperado, visto que o grau de ordem do sistema diminui ao longo da cadeia acil, a partir da interface da membrana¹⁰⁰.

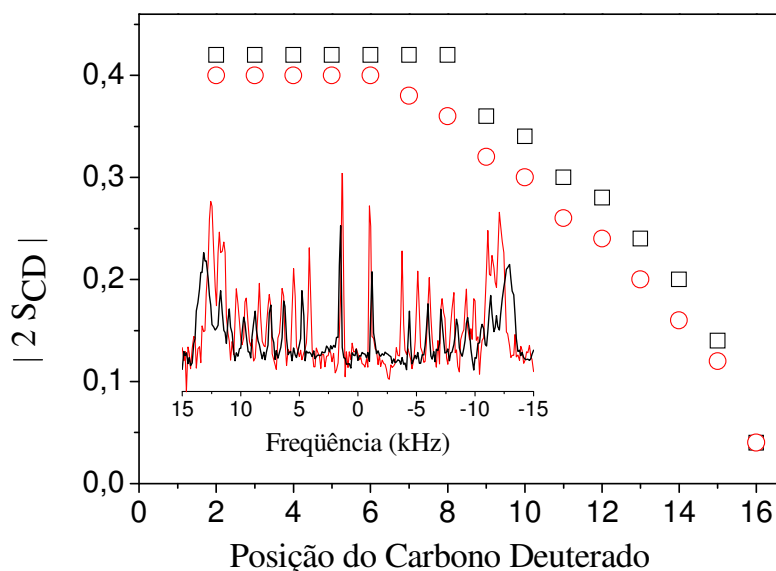


Figura 30 - Influência de melatonina (pontos vermelhos) nos valores de parâmetros de ordem (S_{CD}) de lipossomas contendo EPC: $^2H_{31}$ -POPC (pontos pretos). Razão fármaco: lipídio 1: 3. Detalhe: espectros de 2H RMN de vesículas EPC: $^2H_{31}$ -POPC na ausência (espectro preto) e presença (espectro vermelho) de melatonina, após deconvolução espectral. Os lipossomas foram preparados em tampão de diálise contendo água desprovida de D_2O . Os valores de S_{CD} foram obtidos a partir de espectros de RMN em estado sólido, a 76,8 MHz.

Os resultados demonstrados na figura 30 indicam que a melatonina induziu um efeito de desordem em todos os carbonos deuterados da cadeia acil de EPC: $^2H_{31}$ -POPC. O efeito de desordem foi mais evidente na região compreendida entre o carbono 7 e 14. Na literatura está descrito que o valor estimado da área ocupada por uma molécula de melatonina é cerca de $1,3 \text{ nm}^2$ ¹⁶⁰. Desta forma, considerando a espessura de uma bicamada de DMPC como aproximadamente 5 nm ¹⁷, a interação direta de melatonina

com os ^2H associados ao terminal da cadeia não é esperada. É possível também associar estes resultados com os obtidos através das medidas de tempo de relaxação longitudinal (T_1) de ^1H e ^{13}C , apresentados na sessão 5.1.2.2. Assim sendo, a desordem provocada na região terminal da cadeia pode ser justificada pelo fato de que a melatonina pode estar distribuída entre as moléculas dos fosfolipídios, como indicado nos estudos de T_1 (sessão 5.1.2.2.), diminuindo a interação entre lipídios, e que a mobilidade molecular aumenta em direção a região terminal da cadeia lipídica.

5.1.2.3.2. Espectroscopia de RMN de ^{31}P

De forma a obter informações sobre os efeitos da melatonina na cabeça polar dos lipídios, os espectros de RMN de ^{31}P foram obtidos em MLV de EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC, na ausência e presença de melatonina incorporada, a 25°C (Figura 31). Não foram observadas mudanças consideráveis, induzidas pelo composto, na forma do espectro e tampouco nos valores de anisotropia de deslocamento químico de $^2\text{H}_{27}$ -DMPC, obtidos em diferentes temperaturas (Figura 32).

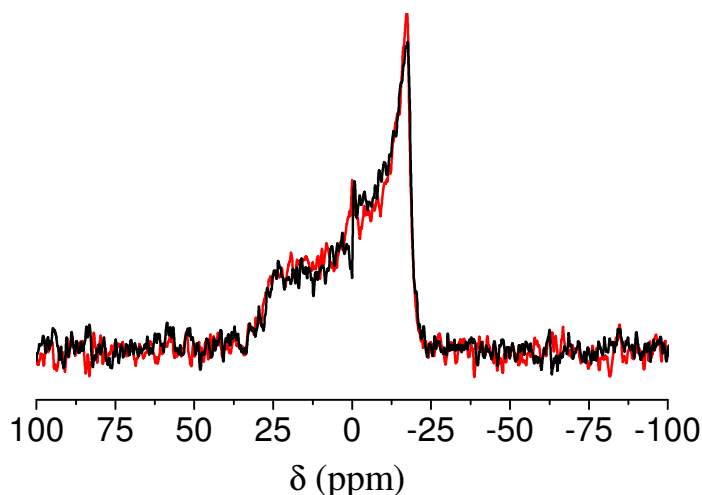


Figura 31 - Espectros de RMN de ^{31}P de lipossomas contendo EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC, com (espectro vermelho) e sem (espectro preto) melatonina (Mel). Razão fármaco: lipídio 1: 3. Os lipossomas foram preparados em tampão de diálise e os espectros obtidos por RMN no estado sólido (202,3 MHz).

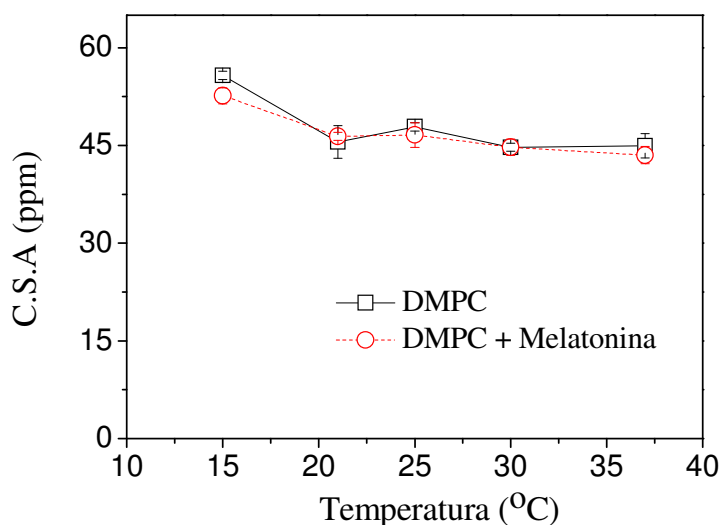


Figura 32 - Variação térmica dos valores de anisotropia de deslocamento químico (C.S.A.) de ^{27}H -DMPC, em função da incorporação de melatonina (Mel) no sistema. Razão fármaco: lipídio 1: 3. Os lipossomas foram preparados em tampão de diálise. Os espectros de RMN foram obtidos em estado sólido, a 202,3 MHz.

Assim sendo, tais resultados sugerem que a melatonina não induz mudanças consideráveis no comportamento da região próxima a região dos fosfatos dos lipídios.

5.1.2.4. Estudos referentes à topologia da membrana: RMN de ^1H com MAS

Os experimentos realizados nestes estudos foram obtidos em duas condições: na ausência e na presença de rotação da amostra no ângulo mágico ($54,7^\circ$). Estes resultados estão reunidos na figura 33. A figura 33A representa um espectro de MLV de EPC: ^{31}H -POPC na presença de melatonina, obtido na condição cuja amostra está estática. Sem a presença de rotação durante a aquisição do espectro, as interações anisotrópicas e dipolares entre os hidrogênios da membrana promovem o alargamento das bandas de ressonância, como já citado anteriormente. Este tipo de experimento pode fornecer informações sobre a partição de um composto na membrana, considerando que os hidrogênios presentes no composto em solução não sofrem influência das interações

citadas. Desta forma, a presença de melatonina em solução no sistema analisado seria indicada pelo aparecimento de picos finos no espectro. A análise do espectro 33A não indicou a presença de melatonina no meio aquoso, o que sugere um alto grau de afinidade da melatonina pela membrana. Esta evidência está de acordo com estudos que calcularam o coeficiente de partição lipídico de melatonina como sendo 2000, para lipossomas de DMPC ⁷⁷.

O espectro da figura 33C demonstra o efeito da presença de melatonina nas ressonâncias dos hidrogênios de EPC: ²H₃₁-POPC (estas últimas mostradas na Figura 33B, na ausência de melatonina). Ambos os espectros foram obtidos através da rotação da amostra no ângulo mágico. A sensibilidade desta técnica permitiu a detecção das ressonâncias não somente dos lipídios testados, mas também das referentes aos hidrogênios da melatonina (ver detalhe Figura 33C). Observando-se a figura 33C, é possível detectar a influência de melatonina nas variações dos valores de deslocamentos químicos de EPC: ²H₃₁-POPC. Tal variação está quantificada na tabela 4.

A influência de melatonina nos deslocamentos químicos do lipídio parece ter sido mais evidente nas ressonâncias dos hidrogênios correspondentes aos grupos colina, glicerol, bem como nos metilenos da cadeia acil (Tabela 4). A faixa de variações de deslocamentos químicos observadas foi de 0,03 a 0,07 ppm em direção ao campo alto. Assim sendo, a melatonina parece ter causado um efeito de blindagem nestes grupos. Este efeito pode ter sido provocado por um efeito de corrente de anel, associado ao grupo indólico da melatonina.

Os resultados obtidos através dos experimentos de NOESY indicaram interações espaciais dos grupos específicos dos lipídios com os hidrogênios do grupo indol da melatonina (Figura 34 e Tabela 5), o que confirma a influência de efeito de corrente de anel no comportamento da membrana.

A interação entre os hidrogênios do grupo indol da melatonina e o grupo colina do lipídio confirma uma influência, ainda que fraca, do antioxidante com a região da cabeça lipídica, apesar dos resultados obtidos com a RMN de ^{31}P não ter demonstrado isso. A cabeça lipídica pode assumir conformações diferentes em uma membrana, em função da associação entre lipídios. Isto pode justificar os efeitos distintos da melatonina na região colina e nas outras regiões próximas ao grupo fosfato no lipídio.

Tabela 4- Variações dos deslocamentos químicos dos hidrogênios referentes ao sistema EPC: $^2\text{H}_{31}$ POPC ($\Delta\delta$, ppm), induzidos por melatonina.

Hidrogênios de EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC	δ (ppm)		$\Delta\delta$ (ppm)
	sem melatonina	com melatonina	
-CH ₃	0,88	0,87	- 0,01
-CH ₂	1,28	1,25	- 0,03*
-CH ₂ -C-C=O	1,59	1,52	- 0,07*
CH ₂ -C-C=C	2,02	1,99	- 0,03*
-CH ₂ -C=O	2,33	2,26	- 0,07*
-C=C-CH ₂ -C=C	2,79	2,77	- 0,02
-N (CH ₃) ₃	3,23	3,16	- 0,07*
CH ₂ -N	3,69	3,67	- 0,02
Gly-CH ₂ OP	3,99	3,97	- 0,02
OCH ₂ CN + Gly1-CH ₂ OC	4,27	4,21	- 0,06*
Gly2-CH ₂ OC	4,42	4,37	- 0,05*
CH=CH + gly-CH-O	5,30	5,29	- 0,04*

*variações importantes nos valores de deslocamento químico dos grupos lipídicos.

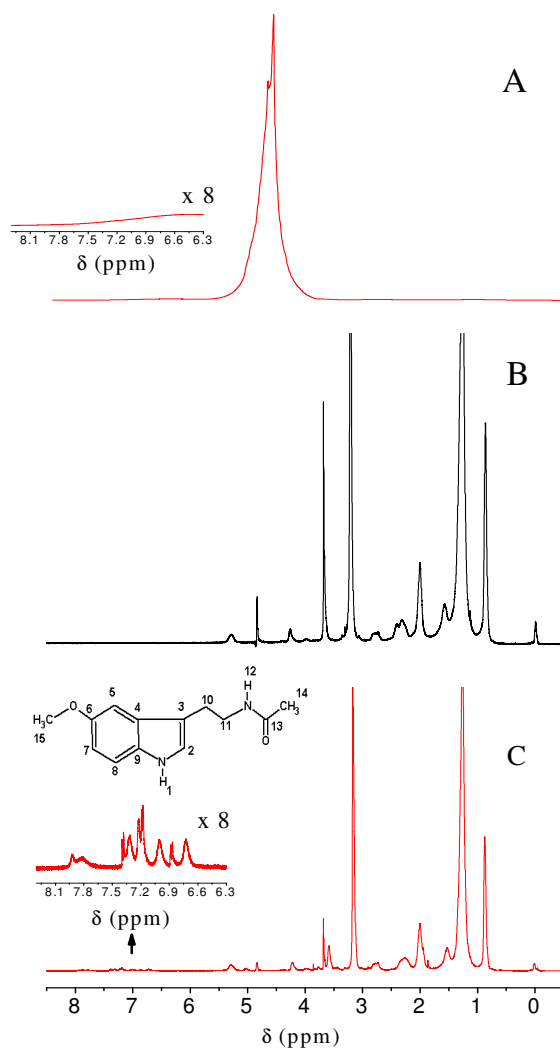


Figura 33 - Espectro de RMN HRMAS de ^1H de lipossomas de EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC na ausência (espectro preto) e presença de melatonina (espectro vermelho). A) espectro de EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC na presença de melatonina, obtido sem rotação da amostra; B) espectro de EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC, obtido com MAS (frequência de rotação 8 kHz); C) influência de melatonina no espectro de EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC (velocidade de rotação 8 kHz). Os detalhes dos gráficos A e C demonstram a região correspondente aos picos dos hidrogênios aromáticos da melatonina. Os espectros foram obtidos por RMN no estado sólido, a 500 MHz. Razão fármaco: lipídio 1: 3.

As interações espaciais mais fortes foram detectadas entre os hidrogênios do grupo indol da melatonina e os metilenos da cadeia alifática do lipídio. Tal resultado

confirma uma penetração da molécula na região não polar da bicamada lipídica. Considerando-se o aumento da mobilidade molecular ao longo das cadeias lipídicas descritas nos estudos de T_1 e RMN de ^2H (sessões 5.1.2.2. e 5.1.2.3.1.), pode-se sugerir que a penetração deve ocorrer até a região onde estão localizados os primeiros carbonos da cadeia acil na membrana.

Os resultados obtidos com RMN HRMAS de ^1H sugerem uma localização preferencial da melatonina pela interface da membrana

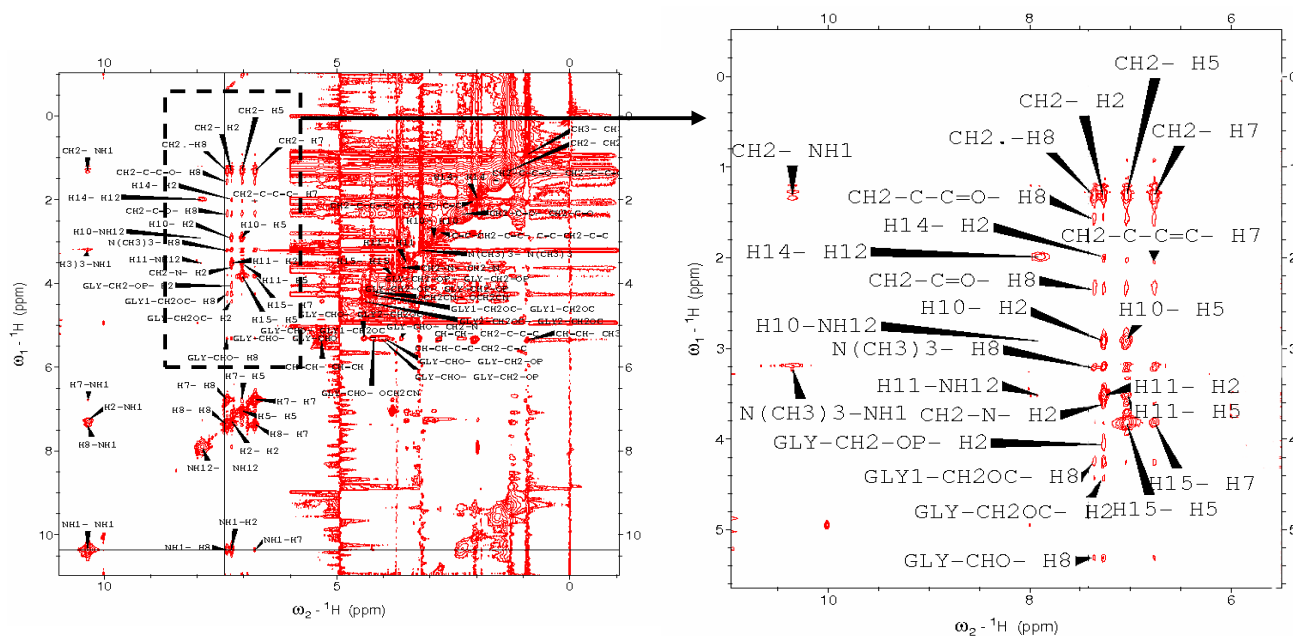


Figura 34- À esquerda: espectro bidimensional de NOESY de lipossomas de EPC: $^2\text{H}_{31}\text{POPC}$, na presença de melatonina. Razão fármaco: lipídio 1: 3. À direita, ampliação do primeiro espectro: interações inter-moleculares lipídio-melatonina (ver Tabela 5).

Os resultados obtidos através dos estudos com RMN geraram uma publicação na revista Journal of Pineal Research e um segundo artigo em preparação a ser submetido na revista FASEB Journal.

Tabela 5- Interações espaciais intermoleculares de NOESY entre melatonina e lipossomas contendo EPC:²H₃₁-POPC (25 °C). F= forte (distância espacial entre moléculas ~ 2,5-3,5Å); m= media (~ 4,0-4,5Å); f= fraca (~ 5,0Å).

Hidrogênios	H ₁	H ₂	H ₅	H ₇	H ₈
CH₂	F	F	F	F	F
CH₂-C-C=O		f	f	f	f
CH₂-C-C=C			f	f	
CH₂-C=O		f	f	f	f
N(CH₃)₃	m	m	m	m	m
Gly-CH₂-OP		f			
Gly1-CH₂-OC		f		f	f
Gly2-CH₂-OC		f			
Gly-CHO		f			f

5.1.3. Medidas de espectroscopia de fluorescência

Considerando a localização da melatonina na interface da membrana, as alterações no grau de empacotamento de lipossomas de EPC, induzidas pela presença de melatonina, foram observadas através das mudanças de comportamento da sonda fluorescente MC-540, apresentadas na Figura 35.

A melatonina parece ter provocado o aumento da emissão de fluorescência da sonda. A análise dos dados obtidos na figura 35 permitiu a detecção de um aumento de 0,26 na razão de intensidade de fluorescência nos comprimentos de onda 580 e de 565 nm (Tabela 6).

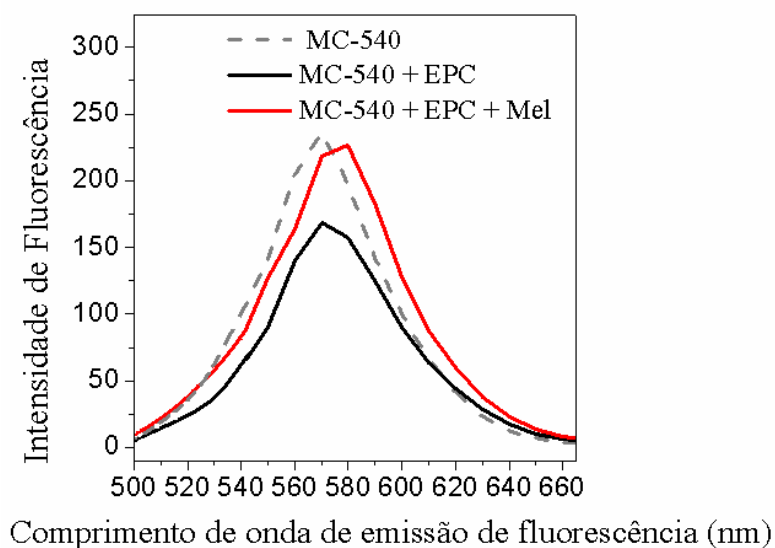


Figura 35 - Espectros de emissão de fluorescência de MC-540 em solução aquosa (curva cinza); na presença de lipossomos de EPC (curva preta) e na presença de lipossomos de EPC contendo melatonina (curva vermelha). Razão fármaco: lipídio 1: 250.

Como dito anteriormente, a merocianina 540 fixa-se na membrana um pouco acima da região glicerol^{125,126}. Logo, os resultados obtidos através de espectroscopia de fluorescência confirmaram os resultados obtidos através de RMN, no que diz respeito à localização da melatonina na interface da membrana (sessão 5.1.2.4.).

Tabela 6 - Influência de melatonina na razão de intensidade de fluorescência nos comprimentos de onda 580 e de 565 nm ($I_{580/565}$).

	I_{580}	I_{565}	$I_{580/565}$
EPC	157,70	140,12	1,12
EPC + Mel	226,63	164,26	1,38

Devido ao fato da sonda não penetrar na região hidrofóbica da membrana, a influência da melatonina nos lipossomas parece ter afetado a razão entre as intensidades de fluorescência nos comprimentos de onda 580 e de 565 nm. Desta forma, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, os resultados de fluorescência indicam que a melatonina provoca uma pequena desordem na organização lipídica da região glicerol, e estão em consonância com os resultados apresentados nos estudos de dinâmica molecular por RMN de ^2H (sessão 5.1.2.3.1.).

5.1.4. Medidas de DSC

O efeito da melatonina no comportamento termotrópico da região hidrofóbica de MLV de EPC também foi avaliado a partir da variação dos valores de entalpia (ΔH) dos lipídios, obtidos em medidas de DSC. As curvas estão representadas na figura 36 e os valores de ΔH listados na tabela 7.

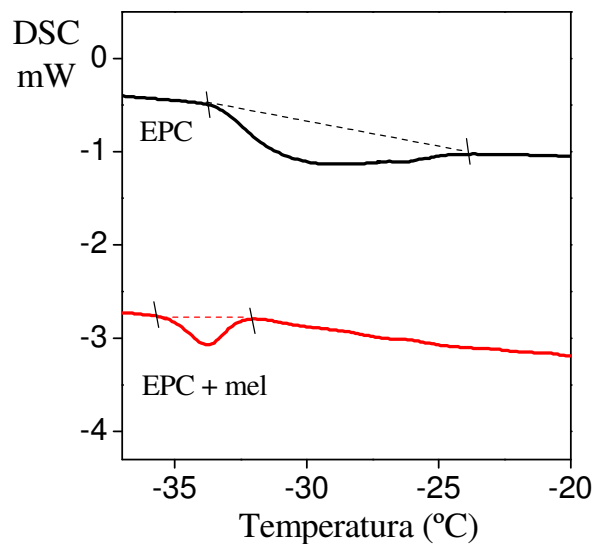


Figura 36 - Curvas de DSC de lipossomas de EPC puros (EPC) e lipossomas de EPC contendo melatonina (EPC+ mel). Razão fármaco: lipídio 1: 264.

O decréscimo de 0,85 J/g no valor de variação de entalpia (ΔH) das curvas endotérmicas indicou que a melatonina induziu um aumento na fluidez das membranas de EPC na região das cadeias acil. As variações nos valores de entalpia no sistema estão intimamente associadas às propriedades das cadeias hidrofóbicas lipídicas, principalmente o número de insaturações²⁴. Desta forma, os resultados obtidos com as medidas de DSC proporcionaram informações complementares às obtidas com as medidas de RMN de ^2H (sessão 5.1.2.3.1.).

Tabela 7 – Parâmetros de DSC obtidos para lipossomas de EPC na ausência e na presença de melatonina.

	ΔH (J/g)
EPC	- 1,11
EPC + Mel	- 0,26
$\Delta\Delta H$ (J/g)	0,85

5.2. Caracterização dos efeitos de melatonina em filmes de Langmuir

Os experimentos com filmes de Langmuir foram realizados através de medidas de variações de área molecular na cuba de Langmuir e por microscopia no ângulo de Brewster de uma monocamada composta por POPC. A influência da melatonina na área molecular, bem como na espessura da membrana está demonstrada na figura 37.

A análise de dados obtidos, representados na figura 37, indicou que a melatonina em excesso, na concentração de 0,22 mM, aumentou em 11% a área total da membrana. Este aumento do valor da área por molécula indicou a inserção da melatonina no filme de Langmuir a partir da subfase, confirmando a interação da melatonina na região polar

da monocamada. Esta interação foi também observada nos resultados obtidos em bicamadas lipídicas, a partir de medidas de RMN (ver sessão 5.1.2.4.).

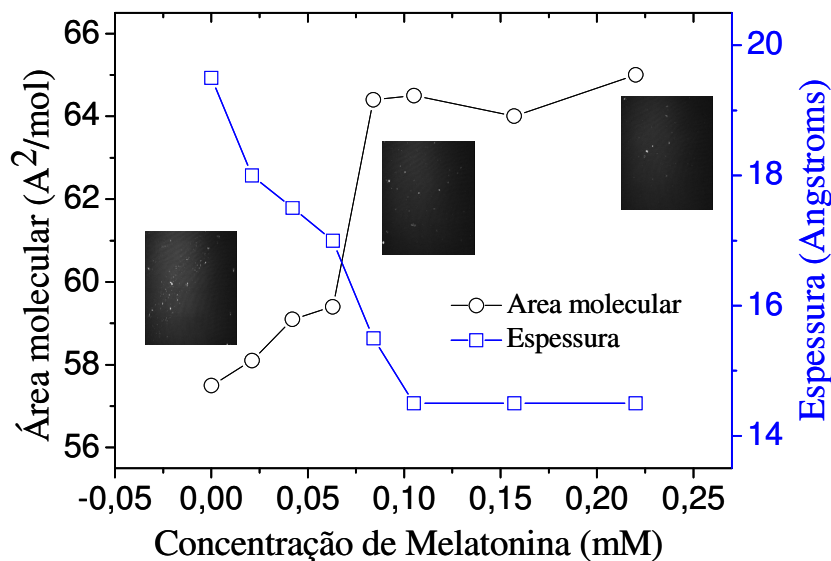


Figura 37 - Variação da área molecular e espessura de uma monocamada de POPC em função da concentração de melatonina incorporada no sistema. As imagens de microscopia no ângulo de Brewster são referentes às concentrações de 0,000; 0,105 e 0,220 mM de melatonina.

As imagens obtidas com a microscopia no ângulo de Brewster não permitiram a visualização das alterações morfológicas, visto que os experimentos foram efetuados a temperatura ambiente, na qual a POPC apresenta-se em estado fluido. Entretanto, os cálculos de espessura da monocamada indicaram que a interação com a melatonina provocou a redução da espessura da monocamada de POPC em aproximadamente 5 Å. A redução da espessura da monocamada pode ter sido causada pelo aumento de moléculas em conformação gauche na região hidrofóbica e rearranjos na organização lipídica, típicos de uma membrana em fase fluida ¹⁶¹. Neste sentido, os resultados obtidos nos filmes de Langmuir também evidenciaram que a melatonina aumenta a fluidez da região hidrofóbica da membrana.

5.3. Caracterização dos efeitos de melatonina em bicamadas lipídicas suportadas em mica

As imagens de AFM relativas a bicamadas suportadas em mica de DMPC puros e na presença de melatonina, na temperatura de 28°C, estão demonstradas na Figura 38. Como dito anteriormente, as regiões mais claras referem-se a domínios mais altos e ordenados da membrana, sendo assim associadas à membrana na fase gel. Da mesma forma, regiões mais escuras correspondem a domínios mais baixos e desordenados, associadas à fase fluida da membrana. Pode-se quantificar a predominância de cada uma destas fases lipídicas nas membranas, a partir de histogramas que descreveram a frequência com que diversos perfis de altura estavam apresentados nas imagens de AFM. Em geral, uma bicamada de DMPC possui altura relativa de 5- 6 nm. A fase fluida, por apresentar desordem no arranjo molecular lipídico, apresenta-se em altura mais baixa, sendo a diferença entre as alturas, quando comparadas a DMPC na fase gel, de no máximo, 1 nm^{17,141}. As análises das figuras obtidas neste trabalho demonstraram uma diferença entre a altura de domínios em fase gel e em fase fluida de aproximadamente 0,5 nm. Ao contrário dos resultados obtidos em lipossomas e filmes de Langmuir, os histogramas obtidos a partir das imagens de AFM, relativos aos perfis de altura das bicamadas, indicaram que a melatonina parece provocar uma inversão de predominância de fases do estado líquido-cristalino para gel, em membranas suportadas, a 28 °C.

A T_m de DMPC suportada em mica é maior do que a temperatura referente ao lipídio sob a forma de lipossomas. Isto se deve às forças de interação impostas pelo confinamento espacial dos lipídios na superfície da mica. As interações entre a mica e a membrana podem eliminar determinados arranjos moleculares da membrana,

favorecendo a presença de uma fase lipídica mais ordenada em comparação às fases de DMPC sob a forma de lipossomas ¹⁷.

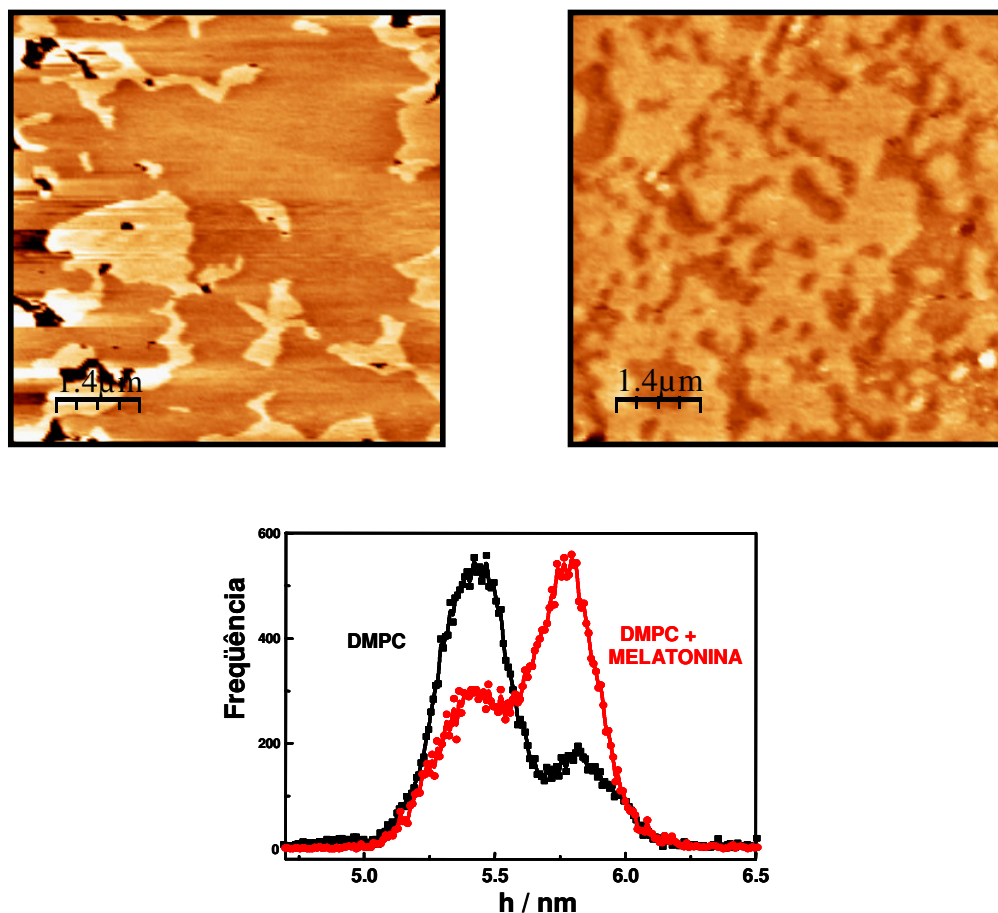


Figura 38 - Imagens de AFM e histogramas relativos a bicamadas suportadas em mica de DMPC (quadro superior à direita) e de DMPC contendo melatonina (quadro superior à esquerda). As imagens foram obtidas a 28 °C. Maiores detalhes estão descritos no texto.

Como já mencionado, a DMPC em lipossomas apresenta T_m em 23,5°C. Quando a temperatura localiza-se abaixo da T_m , a fase lipídica apresenta-se em uma fase gel, bem ordenada. Em temperaturas próximas à T_m , algumas moléculas de lipídio da monocamada superior passam pelo processo de transição de fase principal. Em cerca

de 2 graus acima da T_m , a monocamada superior está completamente na fase fluida, enquanto a monocamada inferior da membrana apresenta-se ainda em fase gel. Assim sendo, pode-se sugerir que a interação entre a monocamada inferior da membrana e a superfície de mica leva a estabilização da primeira, retardando o seu processo de transição de fase de gel para fluida em comparação ao da monocamada superior ¹⁶². Assim sendo, é possível que o efeito de aumento de fluidez da membrana provocado pela melatonina tenha sido influenciado pelas forças de interação entre a mica e a membrana.

Durante os experimentos realizados com AFM para investigar a influência de melatonina em bicamadas suportadas, as caracterizações das bicamadas de fosfatidilcolina através de AFM no modo contato em mica, bem como em ouro foram realizadas. Tais trabalhos propiciaram a publicação de dois artigos em paralelo ao trabalho de tese.

5.4. Caracterização dos efeitos da melatonina em fosfatidilcolinas e implicações biológicas

Neste trabalho, a influência da melatonina na cauda alifática dos lipídios foi evidente. Os resultados de RMN indicaram que a interação com a região hidrofóbica da bicamada pareceu dar-se entre o grupo indol da melatonina e os primeiros carbonos da cauda lipídica. A técnica demonstrou um efeito de desordem na cauda alifática dos lipossomas, provocado por melatonina, a partir da redução dos valores de tempos de relaxação, parâmetro de ordem da cauda apolar e dos momentos espectrais de primeira ordem. A análise dos valores dos momentos espectrais de primeira ordem também indicou uma redução no valor da T_m . Os efeitos termotrópicos da melatonina foram confirmados através de estudos com DSC, que demonstraram uma redução de 0,85 J/g

nos valores de variação de entalpia do lipídio, induzida pelo fármaco. O efeito de desordem na região glicerol do lipídio foi evidenciado pelos resultados obtidos com espectroscopia de fluorescência.

O aumento de fluidez da membrana provocado pela interação da melatonina com as fosfatidilcolinas também foi observado em filmes de Langmuir, nos quais o fármaco parece ter promovido o aumento discreto na área molecular e a redução da espessura das monocamadas.

O efeito do fármaco na região polar da fosfatidilcolina foi menos evidente, quando comparado à sua influência nas caudas apolares. Observou-se, através das medidas de RMN, uma interação da melatonina com a região colina do lipídio (ver sessão 5.1.2.4.). Entretanto, não foram detectadas alterações induzidas pelo fármaco na região próxima ao grupo fosfato do lipídio. A interação entre melatonina e a região polar de fosfatidilcolinas também foi evidenciada através dos estudos em filmes de Langmuir, a partir da penetração da melatonina nas membranas a partir da subfase aquosa.

O fármaco provocou a blindagem em hidrogênios das regiões cabeça, glicerol e cauda do lipídio, como demonstrado nos resultados de RMN, o que sugere uma localização preferencial na interface da membrana. O estudo de espectroscopia de fluorescência, a partir da análise do comportamento de uma sonda fluorescente que se localiza na interface da membrana, confirmou a distribuição da melatonina próximo à região glicerol dos lipídios.

Os resultados obtidos associados à influência de melatonina nos lipossomas e nos filmes de Langmuir foram relacionados com uma de suas propriedades biológicas, especificamente o seu mecanismo de ação antioxidante.

O efeito de desordem provocado pela melatonina na membrana pode prevenir a redução do grau de fluidez da bicamada lipídica, causada pelo processo de lipoperoxidação. A velocidade de peroxidação lipídica é diretamente associada à ordem dos constituintes lipídicos na membrana, aumentando em função da rigidez da membrana ⁹. A formação de domínios rígidos na membrana durante este processo oxidativo se deve ao decréscimo do número de insaturações, ou rearranjo das mesmas ¹⁶³.

Por outro lado, a localização na interface da membrana pode ser estratégica para facilitar interações entre a melatonina e as espécies reativas de oxigênio, melhorando suas propriedades como seqüestrador de tais espécies.

O nível basal de melatonina no plasma do organismo é de aproximadamente 20 pg/mL, o que corresponde a 0,086 μM ¹⁶⁴. A dose terapêutica de melatonina em humanos costuma ser de 1 a 10 mg, se administrada via oral. Quando 2 mg de melatonina é administrada via oral, apenas 15 % do fármaco alcança a circulação sistêmica. Isto corresponde a 0,26 μM de melatonina, considerando como 5 litros o volume sanguíneo ¹⁶⁵. Os 85% restantes são metabolizados no efeito de primeira passagem. A dose usada neste trabalho excede a dose disponível em administrações terapêuticas, o que pode ser justificado pela sensibilidade das técnicas utilizadas com o objetivo de caracterizar o efeito do fármaco na dinâmica lipídica das membranas.

Assim, consideramos que a melatonina é um bom modelo para definir as estratégias de caracterização do efeito dos fármacos em membranas. Os resultados obtidos também estão descritos em um artigo (em preparação). Uma vez que foram estabelecidas as estratégias para obterem-se as informações desejadas, iniciou-se testes com o segundo fármaco, a vincristina. Os primeiros resultados obtidos estão descritos a seguir.

5.5. Estudos de lipossomas incorporados com vincristina

5.5.1. Determinação do percentual de incorporação

A análise dos resultados obtidos indicou que 40 % da vincristina foram incorporados aos lipossomas de EPC (resultados não mostrados). Isto corresponde a 6×10^{-3} mM de vincristina. A quantidade de vincristina incorporada ao sistema depende de dois fatores: a manutenção do gradiente de pH no interior e no exterior dos lipossomas, durante o processo de reconstituição, bem como o grau de permeabilidade da membrana ao fármaco. Estes fatores serão discutidos adiante, visto que estão também relacionados à eficiência terapêutica do fármaco.

5.5.2. Medidas de RMN

5.5.2.1 Identificação da vincristina

Os valores de deslocamento químico e as correlações detectáveis entre os núcleos da vincristina (^1H , ^1H COSY) estão representados na figura 39 e listados na tabela 8.

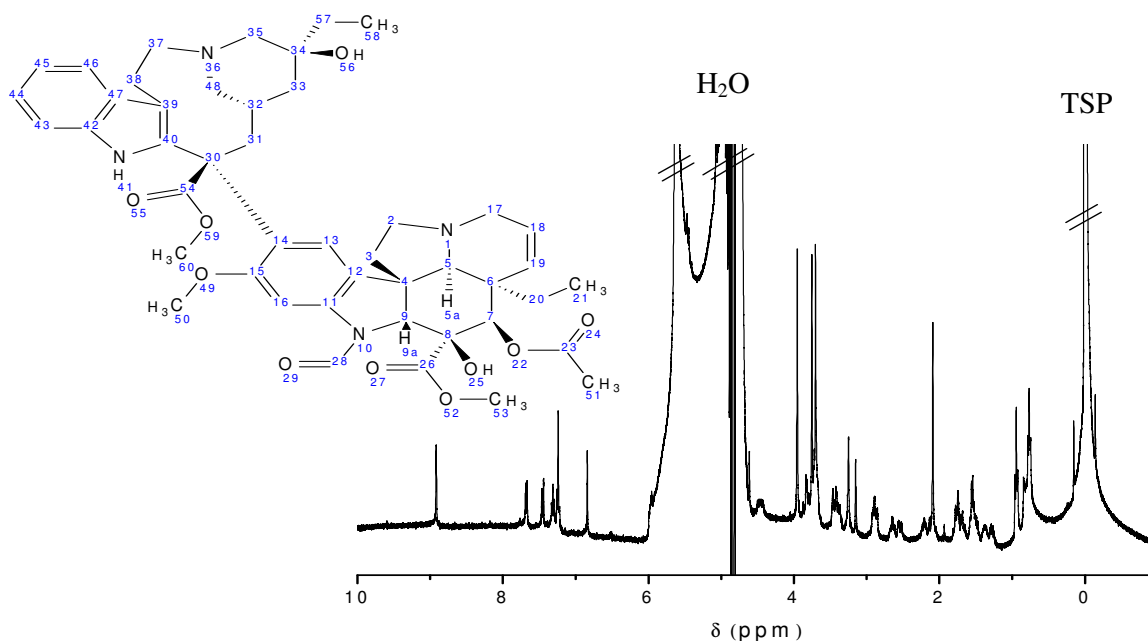


Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H de vincristina (2mM).em $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (80:20, v/v). Os sinais foram obtidos a 400 MHz, usando-se TSP como referência interna.

Tabela 8 - Valores de deslocamentos químico δ (ppm) de ^1H presentes na vincristina e correlações homonucleares.

^1H da vincristina	δ (ppm)	Correlações COSY	^1H da vincristina	δ (ppm)	Correlações COSY
H (2)	2,65	3'; 17	H (38)	3,24	
H (3)	1,74 (3'); 2,07 (3'')	2 (3')	H (41)	7,67	43
H (9)	4,45		H (43)	7,31	41
H (13)	6,84		H (44)	7,23	
H (17)	3,38	2	H (46)	7,43	
H (20)	1,32 (20'); 1,54 (20'')	21	H (48)	2,53	32
H (21)	0,75	20'; 20''	H (50)	3,94	
H (28)	8,91		H (51)	2,09	
H (31)	3,14		H (53)	3,76	
H (33)	1,53		H (57)	1,36	58
H (35)	2,89		H (58)	0,95	57
H (37)	3,42	38			

5.5.2.2. Estudos referentes à dinâmica molecular: Espectroscopia de RMN de ^2H

A figura 40 demonstra os espectros de RMN de ^2H de MLV contendo EPC: $^2\text{H}_{31}$ - POPC na ausência e presença de vincristina.

O espectro dos lipossomas contendo vincristina não apresentou a resolução suficiente para obterem-se dados a partir de uma deconvolução espectral. Entretanto, os valores de desdobramento quadrupolar da banda de ressonância de ^2H de EPC: $^2\text{H}_{31}$ - POPC diminuíram 1,86 kHz após a incorporação de vincristina no sistema, o que indica também uma redução nos valores de parâmetros de ordem dos lipossomas. O resultado sugere um efeito pequeno de desordem na região hidrofóbica da membrana.

O efeito da variação térmica na forma do espectro de RMN de ^2H de $^2\text{H}_{27}$ - DMPC está demonstrado na figura 41. Considerando a T_m de $^2\text{H}_{27}$ - DMPC de 21°C, os

valores de M_1 foram obtidos a partir análise dos espectros obtidos (Figura 42). Os resultados indicam que a vincristina não induz alterações evidentes na transição de fase dos lipossomas.

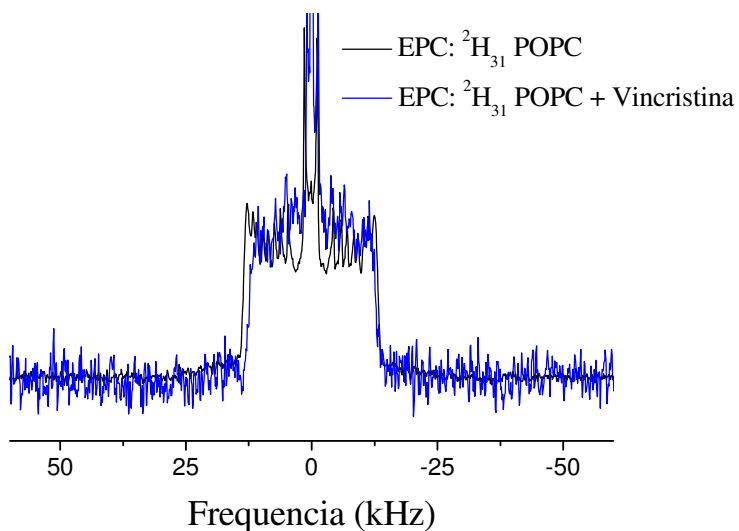


Figura 40 - espectros de RMN de ^2H de EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC na ausência (espectro preto) e presença de vincristina (espectro azul). As amostras foram preparadas em tampão de diálise contendo água desprovida de D_2O . Os espectros foram obtidos por RMN em estado sólido, a 76,8 MHz.

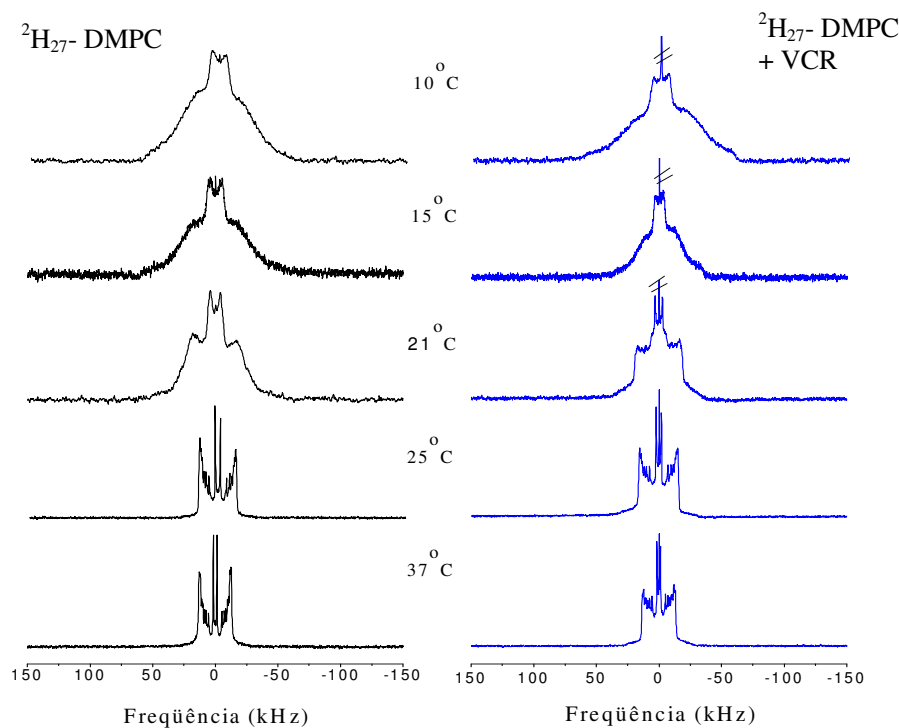


Figura 41- Espectros de RMN de ^2H (estado sólido, 76,8 MHz) de $^2\text{H}_{27}$ -DMPC sem e com vincristina (razão fármaco:lipídio 1:166), em função da temperatura. Os lipossomas estavam contidos em tampão fosfato de sódio pH 7,6 contendo água desprovida de D_2O .

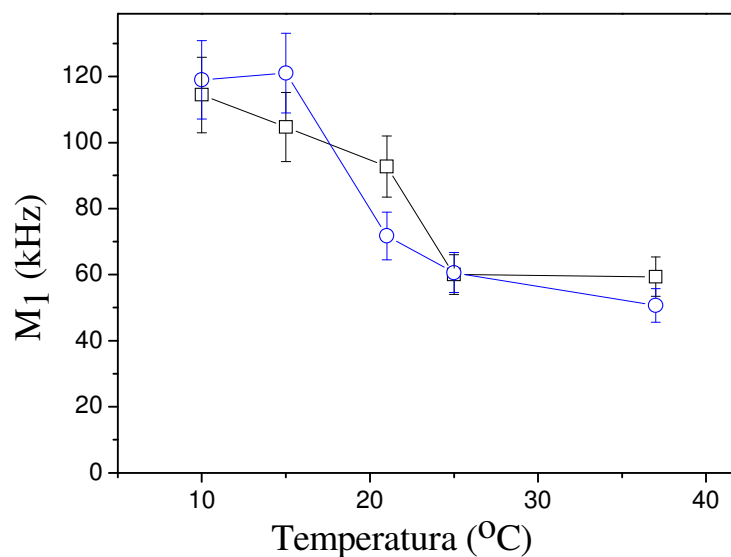


Figura 42- Variação térmica dos valores de momentos espectrais de primeira ordem (M1) de vesículas contendo $^2\text{H}_{27}$ – DMPC sem (curva preta) e com (curva azul) vincristina. Condições experimentais idênticas às descritas na Fig. 41.

5.5.2.3. Estudos referentes à topologia da membrana: RMN de ^1H com MAS

Da mesma forma que os ensaios com melatonina (ver explicações teóricas na sessão 5.1.2.4.), os experimentos realizados nos estudos com RMN de HRMAS de ^1H em lipossomas compostos por EPC: $^2\text{H}_{31}$ - POPC foram obtidos em duas condições: na ausência (Figura 43) e na presença de rotação da amostra no ângulo mágico ($54,7^\circ$) (Figura 44). A análise do espectro da figura 43 não indicou a presença de vincristina no meio aquoso, o que sugere um alto grau de afinidade do antitumoral pela membrana. A alta afinidade da vincristina pela membrana pode ser evidenciada por seu valor de partição octanol:água, de 1,16 ¹⁶⁶.

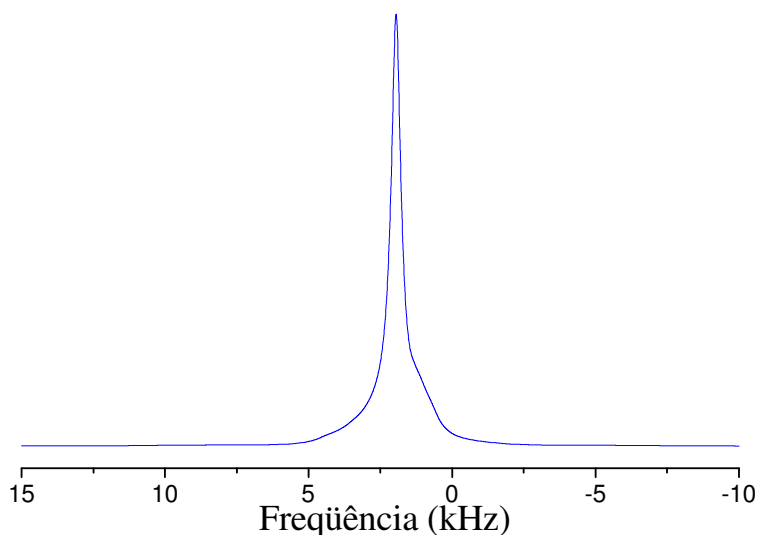


Figura 43 - Espectro de EPC: $^2\text{H}_{31}$ POPC na presença de vincristina, obtido na ausência de rotação no ângulo mágico. Os espectros foram obtidos por RMN no estado sólido, a 500 MHz. Razão fármaco: lipídio 1:166.

A análise das variações dos valores de deslocamento químico ($\Delta\delta$) das ressonâncias de EPC: $^2\text{H}_{31}$ POPC após interação com a vincristina, observadas na figura 44, demonstraram um deslocamento dos valores em direção ao campo baixo, indicando um efeito de desblindagem nos núcleos (Tabela 9). Os resultados descritos nesta tabela sugerem também que a vincristina interage moderadamente com os grupos metilênicos da cadeia não polar, e com um metileno da região glicerol, o que pode ser justificada pela afinidade da vincristina com a membrana, citada anteriormente.

Os resultados obtidos com RMN na caracterização dos efeitos da vincristina em lipossomas de fosfatidilcolina mostraram baixas interações do fármaco com a região hidrofóbica dos lipossomas de EPC: $^2\text{H}_{31}$ - POPC (ver figura 44 e tabela 9). As interações suaves podem ser devido à baixa quantidade de vincristina incorporada nos lipossomas (6×10^{-3} mM). A influência de vincristina na região hidrofóbica da membrana está evidenciada pelos resultados obtidos nos estudos com as outras técnicas.

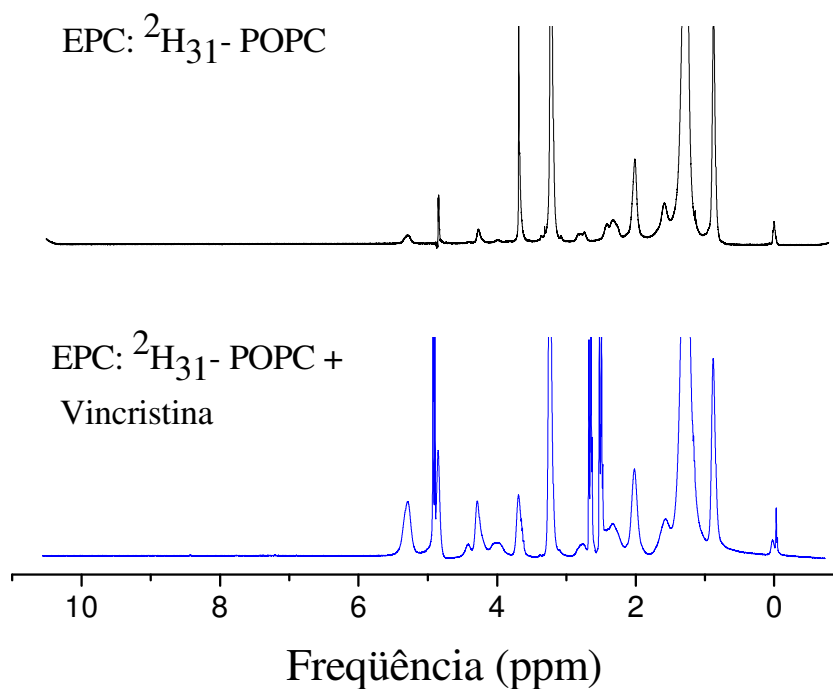


Figura 44 - Espectros de RMN de HRMAS de ^1H de lipossomas de EPC: $^2\text{H}_{31}$ – POPC na ausência (espectro preto) e presença (espectro azul) de vincristina. A razão entre fármaco:lipídio foi de 1:166. Os espectros foram obtidos por RMN no estado sólido, a 500 MHz, com velocidade de rotação de 8 kHz.

Tabela 9- Variações nos valores de deslocamento químico ($\Delta\delta$, ppm) de lipossomas de EPC: $^2\text{H}_{31}$ – POPC após interação com vincristina.

^1H	δ , ppm dos ^1H lipídicos sem vincristina	δ , ppm dos ^1H lipídicos com vincristina	$\Delta\delta$ (ppm)
CH3	0,88	0,89	0,01
CH2	1,27	1,30	0,03*
CH2-C-C=C	2,01	2,04	0,03*
(CH3)3-N	3,24	3,25	0,01
CH2N	3,70	3,71	0,01
Gly-CH2-OC	4,28	4,31	0,03*

* alterações consideráveis nos valores de deslocamento químico.

5.5.3. Medidas de espectroscopia de fluorescência

A figura 45 demonstra os efeitos da interação vincristina-membrana no comportamento da sonda MC-540 em lipossomas de EPC.

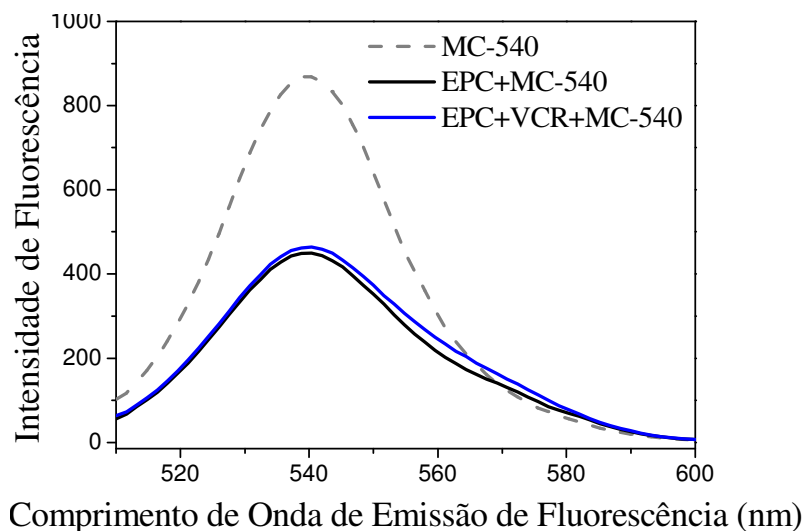


Figura 45 - Espectros de emissão de fluorescência de MC-540 em solução aquosa (curva cinza); na presença de lipossomas de EPC (curva preta) e na presença de lipossomas de EPC contendo vincristina (curva azul).

A diferença entre as intensidades de fluorescência nos comprimentos de onda de 580 e 565 nm foi mínima ou praticamente nula. A ausência de alterações no comportamento da sonda localizada na região hidrofílica pode ser associada à localização do fármaco na região hidrofóbica do lipídio, o que vai ao encontro das evidências apresentadas nos estudos com RMN. Neste caso, maiores investigações serão necessárias, utilizando-se a análise do comportamento de sondas que se localizam na região hidrofóbica, tais como o difenilhexatrieno (DPH) ¹⁶⁷.

5.5.4. Medidas de DSC

A influência de vincristina nos valores de variação de entalpia das cadeias acil de EPC está demonstrada na figura 46 e quantificada na tabela 10.

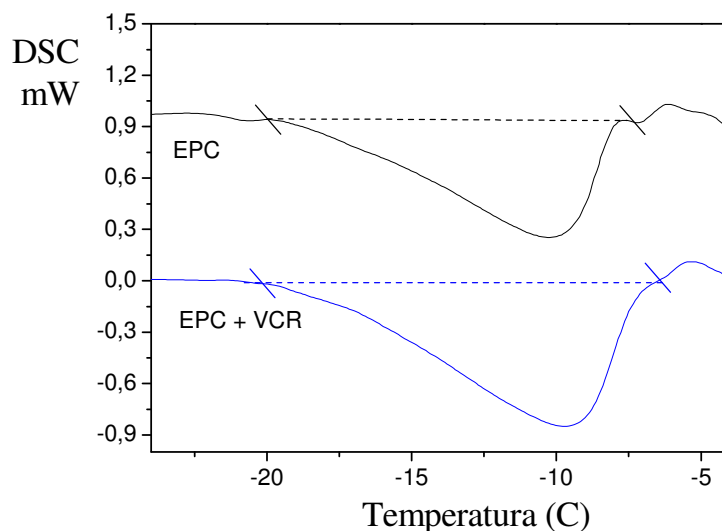


Figura 46 - Curvas de DSC de lipossomas de EPC puros (EPC) e lipossomas de EPC contendo vincristina (EPC+ VCR).

A diminuição nos valores de variação de entalpia de lipossomas de EPC, provocada pela vincristina, confirma a interação do fármaco com a região hidrofóbica da membrana, bem como o efeito de desordem na mesma. Este comportamento também foi observado em estudos referentes a influencia de vinblastina no comportamento termotrópico de lipossomas compostos por DMPC. A vinblastina é um antitumoral que difere da vincristina pela presença de um grupo metila ligado ao nitrogênio do anel indol¹⁶⁸.

Tabela 10 – Parâmetros de DSC obtidos para lipossomas de EPC na ausência e na presença de vincristina.

	ΔH (J/g)
EPC	- 3,96
EPC + VCR	- 2,79
$\Delta\Delta H$ (J/g)	1,17

5.5.5. Caracterização dos efeitos de vincristina em lipossomas de fosfatidilcolina: implicações terapêuticas

Como dito anteriormente, a eficiência terapêutica da vincristina, quando incorporada em lipossomas, é influenciada pela manutenção do gradiente de pH através da membrana dos lipossomas, bem como o grau de permeabilidade da membrana ao fármaco. Estudos anteriores indicaram que a liberação de vincristina e a dissipação do gradiente de pH ocorrem mais rapidamente em lipossomas de EPC/colesterol quando comparados a lipossomas de diestearoilfosfatidilcolina/ colesterol. Desta forma, a vincristina incorporada em sistema contendo diestearoilfosfatidilcolina/ colesterol torna-se mais eficiente como antitumoral ¹⁶⁹.

É possível que estes fatores também tenham influenciado nas respostas discretas obtidas neste trabalho, no que diz respeito ao efeito de vincristina em lipossomas de EPC. Outro fator que pode ter influenciado nos resultados obtidos foi a quantidade de vincristina incorporada nos lipossomas. Outros estudos com o fármaco demonstraram incorporar vincristina em lipossomas em uma razão molar quase 10 vezes superior à utilizada neste trabalho ¹⁷⁰. Os lipossomas eram compostos por diestearoilfosfatidilcolina/colesterol ou por esfingomielina/colesterol, o que reforça a

importância do fator permeabilidade da membrana como determinante nas taxas de incorporação de vincristina.

Tal como a melatonina, a presença do anel indólico na estrutura da vincristina pode estar associado ao efeito de desordem provocado pelo fármaco nas membranas. Espera-se que o arranjo lipídico, bem como o estado de fase, defina as conformações do fármaco incorporado e, conseqüentemente sua ação terapêutica. Entretanto, não foram observados efeitos do fármaco na dinâmica de moléculas de DMPC, que apresenta arranjo mais rígido e impermeável em relação à EPC. É possível que os efeitos da vincristina na membrana dependam da presença de domínios mais fluidos na bicamada, que permitam a sua passagem pela membrana de forma a exercer seu efeito terapêutico.

CAPÍTULO VI- CONCLUSÕES

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSÕES

As estratégias propostas neste trabalho permitiram caracterizar os efeitos da melatonina nos três modelos de membrana utilizados, obtendo-se informações sobre a influência deste fármaco em regiões específicas dos lipídios e relacionar com a atividade antioxidante da molécula.

As estratégias devem ser ajustadas de acordo com as propriedades físico-químicas do fármaco, bem como do modelo de membrana utilizado. No caso da vincristina, os resultados apresentados também permitiram definir os ajustes necessários, tais como razão fármaco-membrana e tipo de sonda fluorescente, de forma a obterem-se mais informações sobre a interação fármaco-membrana. Desta forma, este trabalho pode contribuir para a melhor compreensão de mecanismos de ação e outras propriedades biológicas e aplicações de fármacos.

Uma descrição simplificada dos efeitos dos fármacos nas membranas testadas é descrita a seguir.

6.1. Efeitos da melatonina nos lipossomas de fosfatidilcolina

6.1.1. Concentração de melatonina incorporada

✓ A concentração de melatonina incorporada em lipossomas de EPC foi de 0,05-0,06 mM, sendo esta considerável visto que apresentou atividade *in vitro* contra a lipoperoxidação de membranas por espécies reativas.

6.1.2. Estudos com RMN

✓ A melatonina reduziu os valores de ^1H e de T_1 de ^{13}C específicos da cadeia lateral de lipossomas de EPC;

- ✓ A melatonina induziu a uma redução dos valores de parâmetros de ordem e de M_1 de ^2H , induzido na cadeia acil de EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC;
- ✓ As curvas de variação térmica dos M_1 indicaram uma redução em 3,5 °C na T_m de lipossomas de $^2\text{H}_{27}$ -DMPC, induzida por melatonina;
- ✓ Os resultados descritos acima indicaram um efeito de desordem provocado por melatonina nos lipossomas compostos por fosfatidilcolina;
- ✓ A melatonina interagiu com os ^1H do grupo polar colina de EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC. Não foram detectadas alterações induzidas por melatonina na região polar próxima ao grupo fosfato do lipídio;
- ✓ A melatonina apresentou uma alta afinidade da melatonina por lipossomas de EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC;
- ✓ O grupo indol da melatonina interagiu com os hidrogênios das regiões cabeça, glicerol e cauda de EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC, de forma direta e/ou espacial, o que sugeriu sua localização preferencial na interface da membrana.

6.1.3. Estudos com fluorescência

- ✓ A melatonina parece ter provocado o aumento da emissão de fluorescência da sonda merocianina-540, e aumentou em 0,26 a razão de intensidade de fluorescência nos comprimentos de onda de 580 e 565 nm, indicando um pequeno efeito de desordem na região glicerol da membrana de EPC.

6.1.4. Estudos com DSC

- ✓ O efeito de desordem induzido por melatonina na região hidrofóbica de lipossomas de EPC também foi observado através dos experimentos com DSC. Os ensaios com esta técnica indicaram uma variação de -0,85 J/g nos valores de entalpia do lipídio.

6.2. Efeitos da melatonina em filmes de Langmuir compostos por fosfatidilcolina: estudos de área molecular e microscopia no ângulo de Brewster

- ✓ A melatonina penetrou nas membranas a partir da subfase aquosa, o que evidenciou a interação entre melatonina e a região polar de fosfatidilcolinas;
- ✓ O fármaco provocou um aumento de 11% nos valores de área molecular, bem como a redução da espessura em 5 Å de monocamadas de POPC.

6.3. Efeitos da melatonina em bicamadas lipídicas suportadas em mica compostas por fosfatidilcolina: estudos com AFM

- ✓ A melatonina parece ter provocado uma inversão da predominância de fases, de fluida para gel, de uma bicamada suportada de DMPC. Este comportamento pode ser um reflexo de forças de interação entre o substrato sólido e o lipídio, que influenciaram o efeito da melatonina nestas membranas.

O efeito de desordem provocado pela melatonina na membrana pode prevenir a redução do grau de fluidez da bicamada lipídica, causada pelo processo de lipoperoxidação. Sua localização na interface da membrana pode ser estratégica para facilitar interações entre a melatonina e as espécies reativas de oxigênio, facilitando o seqüestro das espécies reativas pelo fármaco.

6.4. Efeitos da vincristina nos lipossomas de fosfatidilcolina

6.4.1. Concentração de vincristina incorporada

- ✓ A concentração de vincristina incorporada em lipossomas de EPC foi de 0,006 mM.

6.4.1. Estudos com RMN

- ✓ A vincristina em lipossomas EPC: $^2\text{H}_{31}$ -POPC parece ter reduzido os valores de desdobramento quadrupolar da banda de ressonância de ^2H em 1,86 kHz, o que sugere uma redução nos valores de parâmetros de ordem na cadeia acil dos lipídios;
- ✓ A vincristina apresentou uma alta afinidade da melatonina por lipossomas de EPC: $^2\text{H}_{31}$ - POPC;
- ✓ O fármaco interagiu de forma direta, porém discreta, com os hidrogênios presentes na cadeia acil de EPC: $^2\text{H}_{31}$ - POPC, indicando uma localização preferencial na região hidrofóbica da membrana;
- ✓ A vincristina demonstrou pouco ou nenhum efeito em membranas de $^2\text{H}_{27}$ - DMPC.

6.4.2. Estudos com espectroscopia de fluorescência

- ✓ A vincristina não provocou alterações no comportamento de MC-540. Isto pode estar associado à localização do fármaco na região hidrofóbica de EPC.

6.4.3. Estudos com DSC

- ✓ A vincristina parece ter reduzido os valores de variação de entalpia de lipossomas de EPC, confirmando-se a interação do fármaco com a região hidrofóbica da membrana, bem como o efeito de desordem na mesma.

O efeito discreto de vincristina nas membranas utilizadas pode ser devido a influencia da permeabilidade lipídica e manutenção do gradiente de pH nas vesículas. Estes são fatores determinantes da quantidade de vincristina incorporada no sistema lipídico.

CAPÍTULO VII- PERSPECTIVAS

CAPÍTULO VII

7. PERSPECTIVAS

Os resultados e discussões descritos neste trabalho permitiram propor as seguintes perspectivas:

- ✓ Investigar os efeitos da melatonina na região polar dos lipídios através de RMN de ^{15}N ;
- ✓ Observar a influência da melatonina em outros parâmetros termotrópicos de lipossomas, tais como temperatura a meia altura, para obterem-se informações sobre o efeito do fármaco na cooperatividade molecular;
- ✓ Testar diferentes razões molares de melatonina: lipídio em bicamadas ou multicamadas suportadas em mica, de forma a ultrapassar a influencia das forças de interação mica-lipídio no comportamento da membrana;
- ✓ Testar a vincristina incorporada em lipossomas em diferentes razões molares, através de ensaios de RMN de ^{31}P e de ^{15}N , para averiguar seus efeitos na cabeça polar e por RMN de ^2H , para obter maiores informações sobre seus efeitos na cadeia apolar dos lipídios. Nestas condições experimentais, realizar os testes em diferentes associações entre fosfatidilcolinas, variando a composição de acordo com a permeabilidade do sistema;
- ✓ Investigar os efeitos da vincristina em membranas através de estudos de anisotropia de fluorescência de sondas localizadas nas regiões apolares dos lipídios, tais como o difenilhexatrieno;
- ✓ Investigar os efeitos da vincristina em membranas através de estudos de microcalorimetria e AFM, tais como os sugeridos para os ensaios de melatonina.

CAPÍTULO VIII- REFERÊNCIAS

CAPÍTULO VIII

8. REFERÊNCIAS

1. CASTELLI, F.; TROMBETTA, D.; TOMAIANO, A.; BONINA, F.; ROMEO, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A. Dipalmitoylphosphatidylcholine/ linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 37, pp. 135-141, 1997.
2. MORE, B.; BHATT, H.; KUKREJA, V.; AINAPURE, S.S. Miltefosine- great expectations against visceral leishmaniasis. **J. Postgrad. Med.**, v. 49, pp. 101-103, 2003.
3. GAJATE, C.; MOLLINEDO, F. Biological activities, mechanism of action and biomedical prospects of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH₃ (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. **Curr. Drug. Metab.**, v. 3, pp. 491-525, 2002.
4. SÖDERLUND, T. **Membrane Interactions of Small Solutes**. Studies with Drugs and Osmolytes. 2003. 105 f. Tese (Doutorado em Biomedicina), University of Helsinki, Finland.
5. STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 779, pp. 89-137, 1984.
6. TIBERG, F. Improving drug delivery by use of lipid self-assembly particle structures- beyond liposomes and emulsions. **Business Briefing Pharma**

Outsourcing, 2005. Disponível em:

<http://www.touchbriefings.com/pdf/1133/Tiberg.pdf>

7. JANSHOFF, A.; STEINEM, C. Transport across artificial membranes—an analytical perspective. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 385, pp. 433-451, 2006.
8. OHVO- REKILÄ, H.; RAMSTED, B.; LEPPIMÄKI, P.; SLOTTE, J. P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. **Prog. Lipid Res.**, v. 41, pp. 66-97, 2002.
9. MCLEAN, L. R.; HAGAMAN, K. A. Effect of lipid physical state on the rate of peroxidation of liposomes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 12, pp. 113-119, 1992.
10. BOMAN, N.L.; MASIN, D.; MAYER, L.D.; CULLIS, P.R.; BALLY, M.B. Liposomal vincristine which exhibits increased drug retention and increased circulation longevity cures mice bearing P388 tumors. **Cancer Res.**, v. 54, pp. 2830-2833, 1994.
11. GREBEŇOVÁ, D.; KUŽELOVÁ, K.; FUCHS, O.; HALADA, P.; HAVLIČEK, V.; MARINOV, I.; HRKAL, Z. Interferon-alpha suppresses proliferation of chronic myelogenous leukemia cells K562 by extending cell cycle S-phase without inducing apoptosis. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 32, pp. 262-269, 2004.
12. FENG, Z.; QIN, C.; CHANG, Y.; ZHANG, J. Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, pp. 101-109, 2006.

13. ZIMMER, G.; SCHIRMER, H.; BASTIAN, P. Lipid-protein interactions at the erythrocyte membrane. Different influence of glucose and sorbose on membrane lipid transition. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 401, pp. 244-255, 1975.
14. STILLWELL, W.; WASSALL, S.R.; DUMAUAL, A.C.; EHRINGER, W.D.; BROWNING, C.W.; JENSKI, L.J. Use of merocyanine (MC-540) in quantifying lipid domains and packing in phospholipid vesicles and tumor cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1146, pp. 136-144, 1993.
15. EL MAGHRABY, G.M.M.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Drug interactions and locations in liposomes: correlation with polar surface areas. **Int. J. Pharm.**, v. 292, pp. 179-185, 2005.
16. DEBOUZY, J.C.; AOUS, S.; DABOUI, V.; NEVEUX, Y.; GENTILHOMME, E. Phospholipid matrix as a target for sulfur mustard (HD): NMR study in model membrane systems. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 18, pp. 397-408, 2002.
17. TOKUMASU, F.; JIN, A.J.; DVORAK, J.A. Lipid membrane phase behavior elucidated in real time by controlled environment atomic force microscopy. **J. Electron Microsc.**, v. 51, pp. 1-9, 2002.
18. SACCANI, J.; CASTANO, S.; BEAURAIN, F.; LAGUERRE, M.; DESBAT, B. Stabilization of phospholipid multilayers at the air-water interface by compression beyond the collapse: a BAM, PM-IRRAS, and molecular dynamics study. **Langmuir**, v. 20, pp. 9190-9197, 2004.
19. KINNUNEN, P.K.J.; KÖIV, A.; LEHTONEN, J.Y.A.; RYTÖMAA, M.; MUSTONEN, P. Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membranes surfaces. **Chem. Phys. Lipids**, v. 73, pp. 181-207, 1994.

20. YEAGLE, P. L. **The membranes of cells**. California: Academic Press, 1993.
21. BENEY, L.; GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 57, pp. 34-42, 2001.
22. MOURITSEN, O.G. Theoretical models of phospholipids phase transitions. **Chem. Phys. Lipids**, v. 57, pp. 179-194, 1991.
23. AUSSENAC, F.; LAGUERRE, M.; SCHMITTER, J.-M.; DUFOURC, E. J. Detailed structure and dynamics of bicelle phospholipids using selectively deuterated and perdeuterated labels. ^2H NMR and molecular mechanics study. **Langmuir**, v. 19, pp. 10468-10479, 2003.
24. ULRICH, A.S.; SAMI, M.; WATTS, A. Hydration of DOPC bilayers by differential scanning calorimetry. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1191, pp. 225-230, 1994.
25. WAGNER, B.A.; BUETTNER, G.R.; BURNS, C.P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. **Biochem.**, v. 33, pp. 4449-4453, 1994.
26. KOPPENOL, W.H. Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. **FEBS Lett.**, v. 264, pp. 165-167, 1990.
27. GIROTTI, A.W. Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems. **J. Lipid Res.**, v. 39, pp. 1529-1542, 1998.
28. LEIBOWITZ, M.E.; JOHNSON, M.C. Relation of lipid peroxidation to loss cations trapped in liposomes. **J. Lipid Res.**, v. 12, pp. 662-670, 1971.
29. BAO, A.; PHILLIPS, W.T.; GOINS, B.; ZHENG, X.; SABOUR, S.; NATARAJAN, M.; WOOLEY, F.R.; ZAVALETA, C.; OTTO, R.A. Potential

- use of drug carried-liposomes for cancer therapy via direct intratumoral injection. **Int. J. Pharm.**, v. 316, pp. 162-169, 2006.
30. AL JAMAL, W.; KOSTARELOS, K. Construction of nanoscale multicompartiment liposomes for combinatory drug delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 331, pp. 182-185, 2007.
31. WILKOP, T.; XU, D.; CHENG, Q. Characterization of pore formation by streptolysin O on supported lipid membranes by impedance spectroscopy and surface plasmon resonance spectroscopy. **Langmuir**, v. 23, pp. 1403-1409, 2007.
32. SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Liposomes: has the magic bullet hit the target? **Quim. Nova**, v. 25, pp. 1181-1115, 2002.
33. HOPE, M.J.; BALLY, M.B.; MAYER, L.D.; JANOFF, A.S.; CULLIS, P.R. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. **Chem. Phys. Lipids**, v. 40, pp. 89-107, 1986.
34. FENSKE, D.B. Structural and motional properties of vesicles as revealed by nuclear magnetic resonance. **Chem. Phys. Lipids**, v. 64, pp. 143-162, 1993.
35. JOHN, K.; SCHREIBER, S.; KUBELT, J.; HERRMANN, A.; MÜLLER, P. Transbilayer movement of phospholipids at the main phase transition of lipid membranes: implications for rapid flip-flop in biological membranes. **Biophys. J.**, v. 83, pp. 3315-3323, 2002.
36. SONE, N.; YOSHIDA, M.; HIRATA, H.; KAGAWA, Y. Reconstitution of vesicles capable of energy transformation from phospholipids and adenosine

- triphosphatase of thermophilic bacterium. **J. Biochem.**, v. 81, pp. 519-528, 1977.
37. CRECZYNSKI-PASA, T.B.; POSSMAYER, F.E.; SCOFANO, H.M.; GRÄBER, P. Characterization of nucleotide binding sites of the isolated H^+ -ATPase from spinach chloroplasts CF_0F_1 . **Arch. Biochem. and Biophys.**, v. 376, pp. 141-148, 2000.
38. SAHOO, S.K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **DDT**, v. 8, pp. 1112-1120, 2003.
39. LICHTENBERG, D.; BARENHOLZ, Y. Liposomes: preparation, characterization and preservation. **Methods Biochem. Anal.**, v. 33, pp. 337-462, 1988.
40. LASIC, D.D. Novel applications of liposomes. **Trends Biotechnol.**, v. 16, pp. 307-321, 1998.
41. WINSLOW, R.M. New transfusion strategies: red cell substitutes. **Annu. Rev. Med.**, v. 50, pp. 337-353, 1999.
42. PETTY, M.C. **Langmuir-Blodgett films- an introduction**. Cambridge, Cambridge University Press, 1996.
43. LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 39, pp. 1848-1906, 1917.
44. MAGET-DANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, pp. 109-140, 1999.

45. MÖHWALD, H. Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. **Ann. Rev. Phys. Chem.**, v. 41, pp. 441-476, 1990.
46. McCONNELL, H. M. Structures and phase transitions in lipid monolayers at the air/water interface. **Ann. Rev. Phys. Chem.**, v. 42, pp. 171-195, 1991.
47. KNOBLER, C.M. Phase transitions in monolayers. **Ann. Rev. Phys. Chem.**, v. 43, pp. 207-236, 1992.
48. GAINES, G.L. **Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces**. New York, Wiley-Interscience, 1966.
49. de MUL, M.N.G.; MANN, J.A. Determination of the thickness and optical properties of a Langmuir film from the domain morphology by Brewster angle microscopy. **Langmuir**, v. 14, pp. 2455-2466, 1998.
50. TIEN, H.T.; SALAMON, Z. Formation of self-assembled lipid bilayers on solid substrates. **Bioelectrochem. Bioenerg.**, v.22, pp. 211-218, 1989.
51. TIEN, H.T.; OTTOVA, A.L. The lipid bilayer concept and its experimental realization: from soap bubbles, kitchen sink, to bilayer lipid membranes. **J. Memb. Sci.**, v. 189, pp. 83-117, 2001.
52. KIESSLING, V.; TAMM, L.K. Measuring distances in supported bilayers by fluorescence interference contrast microscopy: polymer supports an SNARE proteins. **Biophys. J.**, v. 84, pp. 408-418, 2003.
53. TAMM, L.K.; McCONNELL, H.M. Supported Phospholipid Bilayers. **Biophys. J.**, v. 47, pp. 105-113, 1985.
54. SUI, S.; URUMOW, T.; SACKMANN, E. Interaction of insulin receptors with lipid bilayers and specific and nonspecific binding of insulin to supported membranes. **Biochem.**, v. 27, pp. 7463-7469, 1988.

55. ISRAELACHVILI, J. **Intermolecular and surface forces** (2nd ed.). New York, Academic Press, 1992.
56. LIS, L. J.; MCALISTER, M.; FULLER, N.; RAND, R. P.; PERSEGIAN, V. A. Interactions between neutral phospholipid bilayer membranes. **Biophys J.**, v. 37, pp. 657-665, 1982.
57. SEIFERT, U. Configurations of fluid membranes and vesicles. **Adv. Phys.**, v. 46, pp. 13-137, 1997.
58. SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. An overview if the biophysical applications of atomic force microscopy. **Biophys. J.**, v. 107, pp. 133-149, 2004.
59. HEGNER, M.; WAGNER, P.; SEMENZA, G. Immobilizing DNA on gold via thiol modification for atomic force microscopy imaging in buffer solutions. **FEBS Lett.**, v. 336, pp. 452-456, 1993.
60. EGAWA, H.; FURUSAWA, K. Liposome adhesion on mica surface studied by atomic force microscopy. **Langmuir**, v. 15, pp.1660-1666, 1999.
61. RICHTER, R.P.; BRISSON, A.R. Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and Ellipsometry. **Biophys. J.**, v. 88, pp. 3422-3433, 2005.
62. REITER, R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocr. Rev.**, v. 12, pp. 151-180, 1991.
63. REITER, R.J. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. **Endocrine Rev.**, v. 1, pp.109-131, 1980.

64. GUERRERO, J.M.; REITER, R.J. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. **Endocrine Res.**, v. 18, pp. 91-113, 1992.
65. BARRETT, P.; CONGWAY, S.; MORGAN, P.J. Digging deep-structure-function relationships in the melatonin receptor family. **J. Pineal Res.**, v. 35, pp. 221-230, 2003.
66. LISSONI, P.; M. CHILELLI; S. VILLA; L. CERIZZA, G.; TANCINI, G. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. **J. Pineal Res.**, v. 35, pp. 12-15, 2003.
67. MAESTRONI, G.J.; COVACCI, V.; CONTI, A. Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. **Cancer Res.**, v. 54, pp. 2429-2432, 1994.
68. ZHOU, J.N.; LIU, R.Y.; KAMPHORST, W.; HOFMAN, M.A., D.F. SWAAB. Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels. **J. Pineal Res.**, v. 35, pp. 125-130, 2003.
69. PAPPOLLA, M.A.; REITER, R.J.; BRYANT-THOMAS, T.K. Melatonin relieves the neural oxidative burden that contributes to dementias. **Curr. Med. Chem.**, v. 3, pp.233-243, 2003.
70. ABE, M.; REITER, R.J.; ORHIL, P.B.; HARA, M.; POEGGELER, B. Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: evidence for an antioxidative role for melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 15, pp. 94-100, 1994.

71. TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; SAINZ, R.; MAYO, J.L.; ALVARES, F.L.; REITER, R.J. Antioxidant strategies in protection against neurodegenerative disorders. **Expert. Opin. Ther. Patents**, v. 13, pp.1513-1543, 2003.
72. de LIMA, V.R.; MORFIM, M.P.; TEIXEIRA, A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Relationship between the action of reactive oxygen and nitrogen species on bilayer membranes and antioxidants. **Chem. Phys. Lipids**, v. 132, pp. 197-208, 2004.
73. TAN, D.X.; REITER, R.J.; MANCHESTER, L.C.; YAN, M.T.; EL-SAWI, M.; SAINZ, R.M.; MAYO, J.C.; KOHEN, R.; ALLEGRA, M.; HARDELAND, R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Curr. Med. Chem.**, v. 2, pp. 181-197, 2002.
74. ALBARRÁN, M.T.; LÓPEZ-BURILLO, S.; PABLOS, M.I., REITER, R.J.; AGAPITO, M.T. Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light. **J. Pineal Res.**, v. 30, pp. 227-233, 2001.
75. TEIXEIRA, A.; MORFIM, M.P.; CORDOVA, C.A.S.; CHARÃO, C.C.T.; DE LIMA, V.R.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxynitrite. **J. Pineal Res.**, v. 35, pp. 262-268, 2003.

76. ANTUNES, F.; BARCLAY, L.R.; INGOLD, K.U.; KING, M.; NORRIS, J.Q.; SCAIANO, J.C.; XI, F. On the antioxidant activity of melatonin. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, pp. 117-128, 1999.
77. COSTA, E.J.; SHIDA, C.S.; BIAGGI, M.H.; ITO, A.S.; LAMY-FREUND, M.T. How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. **FEBS Lett.**, v. 416, pp. 103-106, 1997.
78. SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; PELLEGRINO, M.L.; TITA, B.; CARUSO, S.; CASTELLI, F. Interaction of melatonin with model membranes and possible interactions in its photoprotective activity. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 53, pp. 209-215, 2002.
79. SEVERCAN, F.; SAHIN, I.; KAZANCI, N. Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes-evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1668, pp. 215-222, 2005.
80. ZHIGALTSEV, I.V.; MAURER, N.; AKHONG, Q.; LEONE, R.; LENG, E.; WANG, J.; SEMPLE, S.C.; CULLIS, P.R. Liposome-encapsulated vincristine, vinblastine and vinorelbine: a comparative study of drug loading and retention. **J. Control. Release**, v. 104, pp. 103-111, 2005.
81. OWELLEN, R.J.; OWENS Jr., A.H.; DONIGIAN, D.W. The binding of vincristine, vinblastine and colchicines to tubulin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 47, pp. 685-691, 1972.

82. OWELLEN, R.J.; HARTKE, C.A.; DICKERSON, R.M.; HAINS, F.O. Inhibition of tubulin-microtubule polymerization by drugs of the vinca alkaloid class. **Cancer Res.**, v. 36, pp. 1499-1502, 1976.
83. LOBERT, S.; VULEVIC, B.; CORREIA, J.J. Interaction of vinca alkaloids with tubulin: a comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. **Biochem.**, v. 35, pp. 6806-6814, 1996.
84. BOMAN, N.L.; BALLY, M.B.; CULLIS, P.R.; MAYER, L.D.; WEBB, M.S. Encapsulation of vincristine in liposomes reduces its toxicity and improves its antitumor efficacy. **J. Liposome Res.**, v.5, pp. 523-541, 1995.
85. WEBB, M.S.; HARASYM, T.O.; MASIN, D.; BALLY, M.B.; MAYER, L.D. Sphingomyelin/cholesterol liposomes significantly enhance the pharmacokinetic and therapeutic properties of vincristine in murine and human tumor models. **Br. J. Cancer**, v. 72, pp.896-904, 1995.
86. CULLIS, P.R.; HOPE, M.J.; BALLY, M.B.; MADDEN, T.M.; MAYER, L.D.; FENSKE, D.B. Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1331, pp. 187-211, 1997.
87. SANDERS, J.K.M.; HUNTER, B.K. **Modern NMR spectroscopy: a guide for chemist**. New York, Oxford University Press, 1993.
88. MILHAUD, J. New insights into water-phospholipid model membrane interactions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1663, pp. 19-51, 2004.

89. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. Singapore, John Wiley & Sons, 1991.
90. GRELARD, A.; COUVREUX, A.; LOUDET, C.; DUFOURC, E. J. Solution and solid state NMR of lipids. **Methods Mol. Biol.** 2007, in press.
91. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Principles of instrumental analysis**. USA, Hartcourt Brace & Company, 1998.
92. LEPORE, L.S.; ELLENA, J.F.; CAFISO, D.S. Comparison of the lipid acyl chain dynamics between small and large unilamellar vesicles. **Biophys. J.**, v. 61, pp. 767-775, 1992.
93. FEIGENSON, G.W.; CHAN, S.I. Nuclear magnetic relaxation behavior of lecithin multilayers. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 96, pp. 1312-1319, 1974.
94. DUFOURC, E. J. Solid-state NMR in biomembranes. In: LARIJANI, B.; ROSSER, C. A.; WOSCHOLSKI, R. **Chemical biology: applications and techniques**. London, John Wiley & Sons, pp 113-131, 2006.
95. KROON, P.A.; KAINOSHO, M.; CHAN, S.I. Proton magnetic resonance studies of lipid bilayer membranes Experimental determination of inter- and intramolecular nuclear relaxation rates in sonicated phosphatidylcholine bilayer vesicles. **Biochim. Biophys. Acta** , v. 433, pp. 282-293, 1976.
96. BROWN, M.F. Theory of spin-lattice relaxation in lipid bilayers and biological membranes. Dipolar relaxation. **J. Chem. Phys.**, v. 80, pp. 2808-2831, 1984.
97. LAWS, D. D.; BITTER, H. L.; JERSCHOW, A. Solid-state NMR spectroscopic methods in chemistry. **Angew. Chem. Int.**, v. 41, pp. 3096-3129, 2002.

98. SEELIG, J. ^{31}P nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 515, pp. 105-140, 1978.
99. SEELIG, J., Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. **Q. Rev. Biophys.**, v. 10, pp. 353-418, 1977.
100. DAVIS, J. H. The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by ^2H NMR. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 737, pp. 117-171, 1983.
101. ANDREW, E. R.; BRADBURY, A.; EADES, R. G. Nuclear magnetic resonance spectra from a crystal rotated at high speed. **Nature**, v. 182, pp. 1659, 1958.
102. NEUHAUS, D.N.; WILLIAMSON, M.P. **The nuclear overhauser effect in structural and conformational analysis**. New York, VCH, 1989.
103. BURNETT, L. J.; MÜLLER, B. H. Deuteron quadrupolar coupling constants in three solid deuterated paraffin hydrocarbons: C_2D_6 , C_4D_{10} , C_6D_{14} . **J. Chem. Phys.**, v. 55, pp. 5829-5831, 1971.
104. DUFOURC, E. J.; SMITH, I. C. P.; JARELL, H. C. H-NMR structural and dynamical approach. **Biochem.**, v. 23, pp. 2300-2309, 1984.
105. LAFLEUR, M.; CULLIS, P. R.; FINE, B.; BLOOM, M. Comparison of the orientational order of lipid chains in the L_α and H_{II} phases. **Biochem.**, v. 29, pp. 8325-8333, 1990.
106. LAFLEUR, M.; FINE, B.; STERNIN, E.; CULLIS, P. R.; BLOOM, M. Smoothed orientational order profile of lipid bilayers by ^2H -nuclear magnetic resonance. **Biophys. J.**, v. 56, pp. 1037-1041, 1989.
107. BLOOM, M.; DAVIS, J. H.; MACKAY, A. L., Direct determination of the oriented sample NMR spectrum from the powder spectrum for systems with local axial symmetry. **Chem. Phys. Letters**, v. 80, pp. 198-202, 1981.

108. STERNIN, E.; BLOOM, M.; MACKAY, A. L. De-Pake-ing of NMR spectra. **J. Magn. Reson.**, v. 55, pp. 274-282, 1983.
109. BLOOM, M.; BURNELL, E. E.; MACKAY, A. L.; NICHOL, C. P.; VALIC, M. I.; WEEKS, G. Fatty acyl chain order in lecithin model membranes determined from proton magnetic resonance. **Biochem.**, v. 17, pp. 5750-5762, 1978.
110. JARRELL, H. C.; BYRD, R. A.; SMITH, I. C. P. Analysis of the composition of mixed lipid phases by the moments of ^2H NMR spectra. **Biophys. J.**, v. 34, pp. 451-463, 1981.
111. BECK, J. G.; MATHIEU, D.; LOUDET, C.; BUCHOUX, S.; DUFOURC, E. J. Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks. **FASEB J.**, v. 21, pp. 1714-1723, 2007.
112. DAVIS, J. H. Deuterium magnetic resonance study of the gel and liquid crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine. **Biophys. J.**, v. 27, pp. 339-358, 1979.
113. DAVIS, J. H.; MARAVIGLIA, G.; WEEKS, G.; GODIN, D. V. Bilayer rigidity of the erythrocyte membrane ^2H NMR of a perdeuterated palmitic acid probe. **Biophys. J.**, v. 550, pp. 362-366, 1979.
114. BIENVENUE, A.; BLOOM, M.; DAVIS, J. H.; DEVAUX, P. F. Evidence for protein-associated lipids from deuterium nuclear magnetic resonance studies of rhodopsin- dimyristoylphosphatidylcholine recombinants. **J. Biol. Chem.**, v. 257, pp. 3032-3038, 1982.
115. LINSEISEN, F. M.; BAYERL, S.; BAYERL, T. M. ^2H -NMR and DSC study of DPPC-DODAB mixtures. **Chem. Phys. Lipids**, v. 83, pp. 9-23, 1996.

116. DUFOURC, E. J.; MAYER, L. D.; STOHRER, J.; ALTHOFF, G.; KOTHE, G. Dynamics of phosphate head groups in biomembranes. Comprehensive analysis using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance lineshape and relaxation time measurements. **Biophys. J.**, v. 61, pp. 42-57, 1992.
117. BERDEN, J. A.; CULLIS, P. L.; HOULT, D. I.; MCLAUGHLIN, A. C.; RADDA, G. K.; RICHARDS, R. E., Frequency dependence of ^{31}P NMR line widths in sonicated phospholipid vesicles: effects of chemical shift anisotropy. **FEBS Lett.**, v. 46, pp. 55-58, 1974.
118. TIMOSZYK, A.; GDANIEC, Z.; LATANOWICZ, L. The effect of polysialic acid on molecular dynamics of model membranes studied by ^{31}P -NMR spectroscopy. **Solid State Nucl Magn Reson.**, v. 25, pp. 142-145, 2004.
119. CRONEY, J.C.; JAMESON, D.M.; LEARMONTH, R.P. Fluorescence spectroscopy in biochemistry: teaching basic principles with visual demonstrations. **Biochem. Mol. Biol. Educ.**, v. 29, pp. 60-65, 2001.
120. GOÑI, F.M.; ALONSO, A. Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution and permeabilization by detergents. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1508, pp. 51-68, 2000.
121. GHOSH, C.; DICK, R.M.; ALI, S.F. Iron / ascorbate-induced lipid peroxidation changes membrane fluidity and muscarinic cholinergic receptor binding in rat frontal cortex. **Neurochem. Int.**, v. 23, pp. 479-484, 1993.
122. ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, pp. 845-850, 1998.

123. SANTOS, N.C.; PRIETO, M.; CASTANHO, M.A.R.B. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1612, pp. 123-135, 2003.
124. De PLANQUE, M.R.R.; BONEV, B.B.; DEMMERS, J.A.A.; GREATHOUSE, D.V.; KOEPPE II, R.E.; SEPAROVIC, F.; WATTS, A.; KILLIAN, J.A. Interfacial anchor properties of tryptophan residues in transmembrane peptides can dominate over hydrophobic matching effects in peptide-lipid interaction. **Biochem.**, v. 42, pp. 5341-5348, 2003.
125. LELKES, P.I.; MILLER, I.R. Perturbations of membrane structure by optical probes: I. Location and structural sensitivity of merocyanine- 540 bond to phospholipid membranes. **J. Membr. Biol.**, v. 52, pp. 1-15, 1980.
126. WILLIAMSON, P.; MATTOCKS, K.; SCHLEGEL, R.A. Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 732, pp. 387-393, 1983.
127. VERKMAN, A. S. Mechanism and kinetics of merocyanine 540 binding to phospholipid membranes. **Biochem.**, v. 26, pp. 4050-4056, 1987.
128. McELHANEY, R.N. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. **Chem. Phys. Lipids**, v. 30, pp. 229-259, 1982.
129. BILTONEN, R.L.; LICHTENBERG, D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. **Chem. Phys. Lipids**, v. 64, pp. 129-142, 1993.

130. HÖHNE, G.W.H.; HEMMINGER, W.; FLAMMERSHEIM, H.-J. **Differential scanning calorimetry: an introduction for practitioners**. Germany: Springer, 1996.
131. PORTER, R.F.; JOHNSON, J.M. **Analytical Calorimetry**. New York, 1968.
132. EXEROWA, D. Chain-melting phase transition and short-range molecular interactions in phospholipid foam bilayers. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 96, pp. 75-100, 2002.
133. ZHAO, L.; FENG, S.S. Effects of lipid chain length on molecular interactions between paclitaxel and phospholipids within model membranes. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 274, p. 55-68, 2004.
134. SCHWARTZ, D.K. Langmuir-Blodgett film structure. **Surf. Sci. Reports**, v. 27, pp. 241-334, 1997.
135. CAETANO, W.; FERREIRA, M.; TABAK, M.; SANCHEZ, M.I.M.; OLIVEIRA, O.N.; KRUGER, P.; SCHALKE, M.; LOSCHE, M. Cooperativity of phospholipid reorganization upon interaction of dipyrindamole with surface monolayers on water. **Biophys. Chem.**, v. 91, pp. 21-35, 2001.
136. RIVIÈRE, S.; HENON, S.; MENNIER, J. J. Textures and phase transitions in Langmuir monolayers of fatty acids. A comparative Brewster angle microscope and polarized fluorescence microscope. **J. Chem. Phys.**, v. 101, pp. 10045-10051, 1994.

137. HÖNIG, D.; MÖBIUS, D. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. **J. Phys. Chem.**, v. 95, pp. 4590-4592, 1991.
138. HÖNIG, D.; MÖBIUS, D. Reflectometry at the Brewster angle and Brewster angle microscopy at the air-water interface. **Thin Solid Films**, v. 210-211, pp. 64-68, 1992.
139. MÜLLER, D.J.; ANDERSON, K. Biomolecular imaging using atomic force microscopy. **Trends. Biotechnol.**, v. 20, pp. S45-S49, 2002.
140. LINDSAY, S.M. Atomic resolution microscopy at the solid-liquid interface. **Curr Sep.**, v. 17, pp. 17-24, 1998.
141. MUNFORD, M.L.; LIMA, V.R.; VIEIRA, T.O.; HEIZELMANN, G.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PASA, A.A. AFM in situ characterization of supported phospholipid layers formed by vesicle fusion. **Microsc. Microanal.**, v. 11, pp. 90-93, 2005.
142. MOU, J.; CZAJKOWSKY, D.; SHAO, Z. Gramicidin A Aggregation in Supported Gel State Phosphatidylcholine Bilayers. **Biochem.**, v. 35, pp. 3222-3226, 1996.
143. TAMM, L.K.; BÖHM, C.; YANG, J.; SHAO, Z.; HWANG, I.; EDIDIM, M.; BETZIG, F. Nanostructure of Supported Phospholipid Monolayers and Bilayers by Scanning Probe Microscopy. **Thin Solid Films**, v. 284, pp. 813-816, 1996.
144. MERINO, S.; DOMENECH, S.; DIEZ, I.; SANZ, F.; VIÑAS, M.; MONTERO, M.T.; HERNÁNDEZ-BORRELL, J. Effects of Ciprofloxacin on *Escherichia*

- coli* Lipid Bilayers: an Atomic Force Microscopy Study. **Langmuir**, v. 19, pp. 6922-6927, 2003.
145. RUIZ, J.; GOÑI, F.M.; ALONSO, A. Surfactant-induced release of liposomal contents. A survey of methods and results. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 937, pp. 127-134, 1988.
146. HE, H.; LIN, M.; HAN, Z.; MUROYA, Y.; KUDO, H.; KATSUMURA, Y. The formation and properties of the melatonin radical: a photolysis study of melatonin with 248 nm laser light. **Org. Biomol. Chem.**, v. 3, pp. 1568-1574, 2005.
147. LI, G.; LI, L.; YIN, D. A novel observation: melatonin interaction with malondiadehyde. **Neuroendocr. Lett.**, v. 26, pp. 61-66, 2005.
148. LOBERT, S.; INGRAM, J.W.; CORREIA, J.J. The thermodynamics of vinca alkaloid-induced tubulin spirals formation. **Biophys. Chem.**, v. 126, pp. 50-58, 2008.
149. DAVIS, J. H.; JEFFREY, K. R.; BLOOM, M.; VALIC, M. I.; HIGGS, T. P. Quadrupolar echo deuteron magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains. **Chem. Phys. Letters**, v. 42, pp. 390-394, 1976.
150. RANCE, M.; BYRD, R. A. Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropic media: Phase-Cycled Hahn-echo spectroscopy. **J. Magn. Reson.**, v. 52, pp. 221-240, 1983.
151. CHEN, Z.; STARK, R. E. Evaluating spin diffusion in MAS-NOESY spectra of phospholipid multibilayers. **Solid State Nucl. Magn. Reson.**, v. 7, pp. 239-246, 1996.
152. BAX, A.; DAVIS, D. G. Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. **J. Magn. Reson.**, v. 63, pp. 207-213, 1985.

153. PIOTTO, M.; SAUDEK, V.; SKLENAR, V. Gradient tailored excitation for single-quantum NMR-spectroscopy of aqueous-solutions. **J. Biomol. NMR**, v. 2, pp. 661-665, 1992.
154. LANGNER, M.; HUI, S.W. Merocyanine 540 as a fluorescence indicator for molecular packing stress at the onset of lamellar-hexagonal transition of phosphatidylethanolamine bilayers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1415, pp. 323-330, 1999.
155. ALLOUCHE, M.; CASTANO, S.; COLIN, D.; DESBAT, B.; KERFELEC, B. Structure and orientation of pancreatic colipase in a lipid environment: PM-IRRAS and Brewster angle microscopy studies. **Biochem.**, v. 46, pp. 15188-15197, 2007.
156. OLSON, F.; HUNT, C.A.; SZOKA, F.C.; VAIL, W.J.; PAPAHA DJOPOULOS, D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 557, pp. 9-23, 1979.
157. DE LIMA, V. R.; CARO, M. S. B.; TAVARES, M. I.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Melatonin location in egg phosphatidylcholine liposomes: possible relation to its antioxidant mechanisms. **J. Pineal Res.**, v. 43, pp. 276-282, 2007.
158. PELL, G.S.; LANDERYOU, M.A.; COTTENDEN, A.M.; ORDIDGE, R.J. NMR investigation of the nature of water in disposable incontinence pads containing superabsorbent polymers and fluffed wood pulp. **Colloid Polym. Sci.**, v. 281, pp. 1127-1135, 2003.
159. BROWN, M.F.; SEELIG, J. Structural dynamics in phospholipid bilayers from deuterium spin-lattice relaxation time measurements. **J. Chem. Phys.**, v. 70, pp. 5045-5053, 1979.

160. SKENE, D. J.; PAPAGIANNIDOU, E.; HASHEMI, E.; SNELLING, J.; LEWIS, D. F. V.; FERNANDEZ, M.; IOANNIDES, C. Contribution of CYP1A2 in the hepatic metabolism of melatonin: studies with isolated microsomal preparations and liver slices. **J. Pineal Res.**, v. 31, pp. 333-342, 2001.
161. SUSI, H.; BYLER, D.M.; DAMERT, W.C. Raman intensities of carbon-carbon stretching modes in a model membrane. **Chem Phy. Lipids**, v. 27, pp. 337-344, 1980.
162. FENG, Z.V.; SPURLIN, T.A.; GEWIRTH, A.A. Direct visualization of asymmetric behavior in supported lipid bilayers at the gel-fluid phase transition. **Biophys. J.**, v. 88, pp. 2154-2164, 2005.
163. BORCHMAN, D.; LAMBA, O. P.; SALMASSI, S.; LOU, M.; YAPPERT, M. C. The dual effect of oxidation on lipid bilayer structure. **Lipids**, v. 27, pp. 261-265, 1992.
164. SCHOCHAT, T.; LUBOSHITZKY, R.; LAVIE, P. Nocturnal melatonin onset is phase locked to the primary sleep gate. **Am. J. Physiol.**, v. 42, pp. R364-R370, 1997.
165. DEMURO, R.L.; NAFZIGER, A.N.; BLASK, D.E.; MENHINICK, A.M.; BERTINO Jr, J.S. The absolute bioavailability of oral melatonin. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 40, pp. 781-784, 2000.
166. LOBERT, S.; FAHY, J.; HILL, B.T.; DUFLOS, A.; ETIEVANT, C.; CORREIA, J.J. Vinca alkaloid-induced tubulin spiral formation correlates with cytotoxicity in the leukemic L1210 cell line. **Biochem.**, v.39, pp. 12053-12062, 2000.

167. SAMUNI, A.M.; BARENHOLZ, Y. Site-activity relationship of nitroxide radical's antioxidative effect. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 34, pp. 177-185, 2003.
168. KYRIKOU, I.; DALIANI, I.; MAVROMOUSTAKOS, T.; MASWADEH, H.; DEMETZOS, C.; HATZIANTONIOU, S.; GIATRELLIS, S.; NOUNESIS, G. The modulation of thermal properties of vinblastine by cholesterol in membrane bilayers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1661, pp. 1-8, 2004.
169. MAYER, L.D.; BALLY, M.B.; LOUGHREY, H.; MASIN, D.; CULLIS, P.R. Liposomal vincristine preparations which exhibit decreased drug toxicity and increased activity against murine L1210 and P388 tumors. **Cancer Research**, v. 50, pp. 575-579, 1990.
170. WATERHOUSE, D.N.; MADDEN, T.D.; CULLIS, P.R.; BALLY, M.B.; MAYER, L.D.; WEBB, M.S. Preparation, characterization, and biological analysis of liposomal formulations of vincristine. **Methods Enzymol.**, v. 391, pp. 40-57, 2005.

ANEXO

Anexo- Artigos publicados ou em preparação

1. MUNFORD, M.L.; LIMA, V.R.; VIEIRA, T.O.; HEIZELMANN, G.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PASA, A.A. AFM in situ characterization of supported phospholipid layers formed by vesicle fusion. **Microsc. Microanal.**, v. 11, pp. 90-93, 2005.
2. DE LIMA, V. R.; CARO, M. S. B.; TAVARES, M. I.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Melatonin location in egg phosphatidylcholine liposomes: possible relation to its antioxidant mechanisms. **J. Pineal Res.**, v. 43, pp. 276-282, 2007.
3. CRECZYNSKI-PASA, T.B.; MILLONE, M.A.D.; MUNFORD, M.L.; DE LIMA, V.R.; VIEIRA, T.O.; BENITEZ, G.A.; PASA, A.A.; SALVAREZZA, R.C.; VELA, M.H. Self assembled dithiothreitol on Au surfaces for biological application: phospholipid bilayers formation. **PCCP**, v. 11, pp. 1077-1084, 2009.
4. DE LIMA, V.R.; TAIB, N.; ODAERT, B.; LAGUERRE, M.; CARO, M.S.B.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; DUFOURC, E.J. Disordering effects induced by melatonin on phospholipids membranes: correlated with its antioxidant properties: a nmr study. Artigo em preparação.

5. DE LIMA, V.R.; CARO, M.S.B.; MUNFORD, M.L.; PASA, A.A.; DESBAT, B.; DUFOURC, E.J; CRECZYNSKI-PASA, T.B.,. Melatonin influence in the order of phosphatidylcholine- based membrane models. Artigo em preparação.